

Aus dem Institut für Klinische Physiologie am Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

KALIUMAKTIVITÄT UND ALDOSTERONSEKRETION IN DER NEBENNIERENRINDE DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Hampel
Berlin

1983



Aus dem Institut für Klinische Physiologie am Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

KALIUMAKTIVITÄT UND ALDOSTERONSEKRETION
IN DER NEBENNIERENRINDE DER RATTE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Hampel
Berlin

1. Referent: Prof. Dr. med. M. Wiederholt

2. Referent: Prof. Dr. med. H. Herken

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18. 5. 1984

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	<u>EINFÜHRUNG IN DAS THEMA</u>	6
1.1	Kurzgefaßte Fragestellung	6
1.2	Morphologie der Nebennierenrinde der Ratte	8
1.2.1	Allgemeiner Überblick	8
1.2.2	Zona glomerulosa	9
1.2.3	Zona fasciculata	10
1.2.4	Zona reticularis	10
1.2.5	Blutversorgung, Interzellularräume, Zellkontakte	10
1.3	Die Nebenniere - eine kurze Historie	11
1.4	Determinanten der Aldosteronsekretion	13
1.4.1	Angiotensin II (AT II)	13
1.4.2	Adrenokortikotropes Hormon (ACTH)	14
1.4.3	Andere Faktoren	15
1.4.4	Natrium	16
1.4.5	Kalium	17
2	<u>METHODE</u>	19
2.1	Auswahl, Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere	19
2.1.1	Tiere	19
2.1.2	Diäten	19
2.1.3	Operatives Vorgehen	20

	Seite
2.2	Meßmethoden 21
2.2.1	Aufbau des Meßplatzes, Versuchsdurchführung 22
2.2.1.1	Inkubationsmedium 23
2.2.2	Messung mit ionenselektiven Elektroden 24
2.2.2.1	Kurzer historischer Überblick 24
2.2.2.2	Messung der Ionenaktivität - theoretische Grundlagen 25
2.2.2.3	Herstellung und Eigenschaften kaliumselektiver Elektroden 31
2.2.3	Messung der Zellpotentiale 32
2.2.4	Aldosteronbestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA) 32
2.3	Statistische Auswertung 34
3	<u>ERGEBNISSE</u> 35
3.1	Membranpotentiale 35
3.1.1	Zellpotentiale der zona glomerulosa von Kontrolltieren 36
3.1.2	Zellpotentiale der zona glomerulosa diätetisch belasteter Tiere 37
3.2	Intrazelluläre Kaliumaktivität 39
3.3	Aldosteronsekretion 44
3.4	Ergebnisse im Überblick 46

	Seite
4 <u>DISKUSSION</u>	48
4.1 Membranpotentiale	48
4.2 Intrazelluläres Kalium	50
4.2.1 Indirekte Hinweise auf die Rolle des kortikalen Kaliums	50
4.2.2 Ergebnisse bei direkter Bestimmung von Kalium in der zona glomerulosa	53
4.2.2.1 Zytoplasmatische Kaliumaktivität und intrazellu- läre Kaliumkonzentration	56
4.2.2.2 Intrazelluläre Kaliumaktivität bei verschiedenen Diäten	60
4.3 Aldosteronsekretion bei verschiedenen Diäten	61
5 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	63
6 <u>LITERATUR</u>	64

1 EINFÜHRUNG IN DAS THEMA

1.1 Kurzgefaßte Fragestellung

Seit der Isolierung des Aldosteron durch die Gruppe um SIMPSON und TAIT 1953/54 (96) und der Möglichkeit seiner meßtechnischen Bestimmung ist dieses Hormon auf reges Interesse in der Forschung und klinischen Praxis gestoßen.

Der Einfluß der verschiedensten körpereigenen Stoffe auf das Sekretionsverhalten des Aldosteron aus der zona glomerulosa der Nebennierenrinde wurde untersucht.

Da Aldosteron die Natrium-Kalium-Balance im Körper regelt, ist der Einfluß dieser beiden Elemente auf seine Biosynthese in vielen Arbeiten beschrieben worden.

Im Vordergrund standen anfangs Messungen, die den direkten Zusammenhang zwischen Natrium- und Kaliumhaushalt und Aldosteronproduktion aufzeigten, ohne jedoch die direkten Angriffspunkte bestimmen zu können. In Tierversuchen wurde bei Natriummangel eine gesteigerte Aldosteronproduktion festgestellt (35). Auch bei Kaliumbelastung in vivo wie in vitro wurde dieser Effekt beobachtet (15, 69). Kaliumverarmung hingegen führte zur Senkung des Aldosteronspiegels (97).

In der Folge konzentrierte sich die Forschung mehr auf die zona glomerulosa selbst. Speziell das Kalium als wichtigstes intrazelluläres Ion ist in vitro mit den verschiedensten Meßmethoden und unter variierenden Versuchsbedingungen gemessen worden. Die Resultate sind widersprüchlich. Messungen mit dem Flammenphotometer zeigten eine Abhängigkeit der Aldosteronsekretion von der intrazellulären Kaliumkonzentration in der zona glomerulosa (7, 67). Diese konnte jedoch mit anderen Meßmethoden wie der Atomabsorptionsspektrophotometrie sowie der Elektronenstrahlmikroprobe

nicht bestätigt werden (27, 79, 102).

Alle Methoden bestimmen die Gesamtkonzentration an Kalium in der zona glomerulosa, nicht jedoch die in der einzelnen Zelle und nicht die Kaliumaktivität. Die Aktivität eines Ions ist aber die biologisch wichtigste Größe im Zusammenspiel der ionalen Kräfte und Wirkungen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, durch geeignete Meßverfahren und Versuchsbedingungen die Nachteile anderer Methoden auszuschalten.

Einerseits wurde die Aldosteronsekretion der zona glomerulosa von Ratten durch verschiedene Diäten physiologisch beeinflusst, andererseits die intrazelluläre Kaliumaktivität direkt in den lebenden Glomerulosazellen in vitro bestimmt. Dies geschah mittels ionenselektiver Mikroelektroden, deren Anwendung seit Jahren das Verständnis über Ionenmilieu und Transportprozesse der Zelle bereichert.

So konnte untersucht werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Aldosteronsekretion und intrazellulärer Kaliumaktivität in der zona glomerulosa besteht.

1.2 Morphologie der Nebennierenrinde der Ratte
(Übersichtsarbeiten: 9, 36, 57, 58)

1.2.1 Allgemeiner Überblick

Die heute gebräuchliche makroskopische Unterteilung der Nebennierenrinde (NNR) stammt von ARNOLD aus dem vergangenen Jahrhundert (4). Durch zusätzliche Beobachtungen ergänzt (50, 89), kann ihr Aufbau folgendermaßen dargestellt werden:



äußere Bindegewebskapsel

zona glomerulosa

zona intermedia

zona fasciculata

zona reticularis

medulläre Bindegewebskapsel

medulla

Abb. 1: Bau der Nebenniere (nach 93)

Zwischen den verschiedenen Tierspezies existieren jedoch große Unterschiede. So haben die Wiederkäuer keine zona fasciculata. Während bei Ratte und Schaf die zona glomerulosa gut ausgebildet ist, ist sie beim Menschen oft schwer zu erkennen. Der Volumenanteil der einzelnen Zonen des Cortex wurde für die Ratte mit

38 %	zona glomerulosa
3 %	zona intermedia
54 %	zona fasciculata
5 %	zona reticularis

angegeben (91), wobei im Vergleich mit anderen Tieren ein hoher Anteil der zona glomerulosa auffällt.

1.2.2 Zona glomerulosa

Die in dieser Arbeit hauptsächlich interessierende Zone erscheint unter dem Mikroskop auf Grund des geringen Lipidgehaltes weiß-gräulich und ist gut abzugrenzen. Ihre Dicke beträgt 4 - 6 Zellschichten mit 50 - 70 μm , wobei der mittlere Zelldurchmesser 10,5 μm beträgt. Die Zellen sind in Haufen oder Schleifen geordnet und werden von Bindegewebssträngen umgeben, die dann radiär zur medulla laufen. Ein relativ großer Kern und ein geringes zytoplasmatisches Volumen sind kennzeichnend.



1.2.3 Zona fasciculata

Diese Schicht ist die breiteste mit rund 500 μm . Sie besteht aus größeren (15 - 20 μm) gelben, cholesterinhaltigen Zellen, die in Strängen radiär angeordnet sind. Diese Stränge werden von Bindegewebe markiert. Das Kern-/Zytoplasmaverhältnis ist kleiner als in der zona glomerulosa.

1.2.4 Zona reticularis

Die innerste Zone erstreckt sich über 100 - 150 μm . Die Zellen sind weniger organisiert und enthalten weniger Cholesterin, sind aber reich an Enzymen. Man findet Zellen um 9 μm und eine andere Gruppe um 13 μm .

1.2.5 Blutversorgung, Interzellularräume, Zellkontakte

Das arterielle Blut wird über ein in der äußeren Kapsel liegendes Gefäßnetz und drei verschiedene Gefäßverläufe den inneren Zonen zugeführt und hauptsächlich von der medullär liegenden Zentralvene abgeleitet. Die Gefäße werden meist von Bindegewebe und einem perivaskulären Raum, ähnlich dem Dissé'schen Raum der Leber, begleitet.

Zwischen den Zellen existiert mit einer mittleren Breite von $0,1\text{ }\mu\text{m}$ ein Interzellularraum, in dem sich die Mikrovilli der kortikalen Zellen bewegen. Auffallend, besonders in der Zona glomerulosa, sind die vielen interzellulären Verbindungen in Form von Desmosomen und weiteren Kontakten, deren Aufgabe noch unklar ist (44).

1.3 Die Nebenniere - eine kurze Historie

Statt eines eigenen Versuchs sei es gestattet, hier einen Auszug aus dem anschaulichen Bericht von ERICH EBSTEIN über die Geschichte der Nebenniere aus dem Jahre 1912 anlässlich der ersten deutschen Übersetzung der Arbeit von TH. ADDISON "On The Constitutional And Local Effectes Of Diseases Of The Supra-Renal Capsules" (Samuel Highly, London 1855) einzufügen:

Entdeckt, beschrieben und abgebildet hat die Glandulae "quae renibus incumbunt" Bartholomaeus Eustachio (+ 1574) im Jahre 1563, nach dem sie auch Glandulae oder Capsulae renales Eustachii genannt werden. Also noch in den anatomischen Werken eines Vesal, Fallopius, Fabricius ab Aquapendente findet man ihrer mit keinem Worte gedacht.

Spigelius (1617), der den Nebennieren mit Rücksicht auf ihre halbmondförmige Gestalt und in Rücksicht auf ihre den Nieren ähnliche Beschaffenheit den Namen: "Renes Succenturiati" beilegte, sagt treuherzig von ihrer Funktion, "ut aliquid dixisse videatur", "factae sunt ad implendum vacuum quod inter renes et diaphragma interstat". Und Joseph Hyrtl fügt noch 1889 in seinem Lehrbuch der Anatomie des Menschen (20. Aufl., S. 787) mit trockenem Humor hinzu: "Spigelius wußte nicht mehr von ihrer Ver- richtung, als wir heute wissen."

Inzwischen hatte Koelliker (1854) in bezug auf die Funktion der Nebenniere bemerkt, daß in ihr zwei funktionell ganz verschiedene Teile vereinigt sind, und zwar möchte er die Rinde ohne weiteres in Beziehung zu den Blutgefäßdrüsen und das Mark zum Nervensystem setzen.

Damit war - 292 Jahre nach Eustachios Entdeckung - das Jahr 1855 herangekommen, in dem Addison sein grundlegendes Werk: "On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal Capsules" herausgab. Dieser Arbeit verdankt die Physiologie von klinischer Seite die erste Beobachtungstatsache, und damit die Kenntnis von der großen Bedeutung der Nebennieren für das Leben des Menschen (33).

Nachdem auch BIEDL 1913 beschrieb (11), daß die Nebenniere bei Fischen lebensnotwendig ist, setzte eine vielfältige Forschung ein. Diese führte in den dreißiger und vierziger Jahren dieses Jahrhunderts zur Entdeckung einer Vielzahl von in der Nebennierenrinde synthetisierten Hormonen. Von der zona glomerulosa nahm SWANN erstmals 1940 an (100), daß sie das "Salz- und Wasser-Hormon" (Aldosteron) produziert. Das wurde durch Arbeiten von GREEP und DEANE (50) und DEANE et al (26) erhärtet, die eine morphologische und histochemische Veränderung der zona glomerulosa bei diätetischer K-Belastung oder Na-Restriktion beobachteten, wodurch sie auf eine erhöhte sekretorische Aktivität dieser Zone schlossen. Einige Jahre später gelang es, von Rindernebennieren eine kristalline Substanz zu erhalten, die chemisch als d-Aldosteron bestimmt (96) und hauptsächlich der zona glomerulosa zugeordnet werden konnte (5, 47). Zu den anderen Zonen sei nur erwähnt, daß die zona fasciculata primär für die Produktion der Glukokortikoide, die zona reticularis für die der Sexualhormone zuständig ist, wobei jedoch eine klare Trennung nicht gemacht werden kann (81).

1.4 Determinanten der Aldosteronsekretion (Übersichtsarbeiten: 18, 74, 82)

Die Zusammenhänge zwischen aldosteronstimulierenden Faktoren und der Aldosteronbiosynthese und -sekretion sind schwer zu durchschauen. So sind diese Faktoren einerseits Ursache, andererseits Ziel der Biosynthese des Aldosteron . Weiterhin lassen die verschiedenen experimentellen Ansätze nur teilweise vergleichbare Ergebnisse zu und unterscheiden sich meist von den natürlichen Lebensbedingungen der Versuchstiere. Für Aktivitätsuntersuchungen der Nebennierenrinde (NNR) werden meist folgende experimentelle Bedingungen gewählt:

- in vivo Untersuchungen bei verschiedenen Diäten
- in vivo und in vitro Perfusion von Nebennieren mit verschiedenen Medien
- in vitro Inkubation von Nebennieren-Gewebe oder NN-Homogenaten in verschiedenen Medien
- Langzeit- oder Kurzzeitversuche

1.4.1 Angiotensin II (AT II)

Angiotensin II, aus Renin über das Angiotensin I gebildet, ist ein wichtiger, bei einigen Spezies vielleicht der hauptsächlichste Regulator der Aldosteronbiosynthese.

Infusionen von geringen Mengen führen bei Versuchstieren und beim Menschen zu einem 2- bis 6-fachen Anstieg der Aldosteronkonzentration im Plasma.

Versuche mit Ratten brachten keine Korrelation oder widersprüchliche Ergebnisse. Jedoch beschrieben COLEMAN et al (24) 1973 bei wachen Tieren eine deutliche Antwort auf Angiotensin II. Angiotensin II wirkt über Rezeptoren, die sich hauptsächlich in der zona glomerulosa befinden (32). Diese ändern sich bei Na-Mangel in Zahl und Affinität schon nach kurzer Zeit.

Neuere Untersuchungen messen auch K-Konzentrationschwankungen eine modulierende Wirkung auf Angiotensin II-Rezeptoren zu (30).

Generell wird angenommen, daß der Einfluß von Angiotensin II auf die frühe Aldosteronbiosynthese auf Ereignisse wie sinkendes Blutvolumen, Salz-mangel und schnelles Wachstum beschränkt ist. Unter Normalbedingungen ist die Angiotensin II-Konzentration im Plasma sehr gering, so daß nur ein Synergismus mit anderen Stimuli in Frage kommt.

1.4.2 Adrenokortikotropes Hormon (ACTH)

Morphologische Studien zeigen, daß ACTH keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die zona glomerulosa, jedoch einen beträchtlichen auf die zona fasciculata und zona reticularis hat (26, 99). Damit stimmt die Feststellung überein, daß bei Hypophysektomie die Produktion der Glukokortikoide um 99 %, die des Aldosteron jedoch nur um die Hälfte sinkt (82).

ACTH stimuliert in vivo und in vitro bei verschiedenen Spezies in hohen Dosen ähnlich Streß-Situationen kurzfristig die Aldosteronbiosynthese. Der Effekt bei physiologischen Dosen und Langzeitversuchen ist gering und die Rolle bei Ruhebedingungen noch unklar.

Die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon wird beeinflußt, ein späterer Angriffspunkt wird diskutiert.

1.4.3 Andere Faktoren

In vitro ist Serotonin ein starker aldosteronstimulierender Faktor. Es wirkt selektiv, wie K-Ionen, nur auf die zona glomerulosa und dort auf die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon über die Induzierung zyklischen AMP's.

In vivo sind mit physiologischen Dosen keine stimulierenden Eigenschaften festgestellt worden.

Das schon erwähnte zyklische AMP hat in vitro ebenfalls stimulierende Eigenschaften. Es scheint eine Vermittlerrolle bei ACTH- und Angiotensin II-Einwirkungen zu spielen, jedoch nicht bei der von Kaliumionen induzierten Aldosteronsynthese. Denn bei maximalem steroidinduziertem Effekt von zugeführtem zyklischem AMP ist die Produktion von Aldosteron noch abhängig von der Kalium-Ionenkonzentration.

Weitere Substanzen, wie Prostaglandine, Histamin, NADPH und L-Thyroxin wurden auf ihre stimulierende Potenz untersucht. Sie steigern die Aldosteronsynthese in verschiedenem Maße, scheinen aber keine große physiologische Rolle zu spielen. Ähnlich K-Ionen, spielen auch andere Kationen wie Ammonium-, Rubidium-, Caesium- und Magnesiumionen eine Rolle bei der Biosynthese des Aldosteron .

Eine ursächliche Wirkung scheint nicht wahrscheinlich und der Effekt von Kalium nur nachgeahmt.

Abwesenheit von Kalziumionen im Inkubationsmedium verhindert den stimulierenden Effekt einiger Substanzen wie K-Ionen, Angiotensin II, ACTH. Sie scheinen deshalb notwendig und eine Schlüsselrolle in der über Angiotensin II vermittelten Aldosteronbiosynthese zu spielen (37).

Nicht zuletzt sei auf die neurogene Steuerung des Aldosteronpools über das Zentralnervensystem (ZNS) hingewiesen. Es reguliert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) über Änderungen des Sympathikotonus der Niere sowohl bei psychischen Stimuli als auch durch den zirkadianen Rhythmus.

Ein direkter Eingriff des ZNS auf die Aldosteronbiosynthese wurde lange diskutiert und untersucht. Ein Nachweis konnte bis heute jedoch noch nicht erbracht werden (53).

1.4.4 Natrium

Daß die Serumelektrolyte durch die Nebennierenrinde beeinflußt werden, zeigte LOEB 1933 (64) und gründete darauf die Kochsalztherapie beim Morbus Addison. Nach vielen indirekten Beweisen konnte durch LUETSCHER und AXELROD 1954 ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Na-Aufnahme und Aldosteronsekretion beim Menschen demonstriert werden (70). So ist unter Na-Mangel eine Hypertrophie und Hyperplasie der zona glomerulosa zu beobachten (26, 49, 95), die schon nach zwei Tagen manifest wird und nach etwa zwei Wochen ein Maximum erreicht (35).

Akute Senkung der Na-Ionenkonzentration im Serum führt zu gesteigerter Aldosteronsekretion (6, 13, 25) sowie auch Na-Mangel bei Langzeitversuchen (2, 35, 75).

Allgemein steigt bei Na-Mangel die Sensibilität der zona glomerulosa gegenüber aldosteronstimulierenden Substanzen wie ACTH, Angiotensin II, Serotonin, Kaliumionen (74, 82). Wie diese Vermittlung zustande kommt, ist noch unklar, da die alleinige Rolle von Na schwer festzustellen ist, weil in vivo mit dessen Änderungen auch

- das intra- und extravasale Volumen geändert wird,
- der Blutdruck und Blutfluß verändert werden,
- das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System anspricht,
- die K-Ionenkonzentration wechselt.

Es spricht vieles dafür, daß Na-Mangel, speziell der akute,

primär durch Veränderungen von Druck und Volumen über das RAAS auf die Aldosteronsekretion Einfluß nimmt und nur einen geringen direkten Effekt auf die Zellen der zona glomerulosa hat (13).

Dabei wird eine durch das zirkulierende Angiotensin II hervorgerufene Änderung der selbständigen Angiotensin II-Rezeptoren in Anzahl und Affinität diskutiert (94).

1.4.5 Kalium

Kalium ist wie Natrium von entscheidender Bedeutung für die lebende Zelle. Seine Konzentration ist in den einzelnen Organen verschieden und ändert sich bei diätetischen Belastungen, so daß bei K-Mangel bei Ratten und anderen Tieren Wachstumsstörungen, Unmöglichkeit der Urinkonzentrierung und früher Tod eintreten (66, 73).

Da die K-Balance auch von Aldosteron geregelt wird, ist es nicht verwunderlich, daß deren Änderung die Aldosteronbiosynthese beeinflußt.

So wurde schon vor Entdeckung des Aldosteron die Wechselwirkung von Na/K-Verhältnis und Zustand der zona glomerulosa demonstriert (26, 100). Danach konnten Beweise für die direkte Stimulation durch Kalium erbracht werden (21, 65, 85). In vivo wie in vitro führt die Erhöhung der Kaliumkonzentration zu gesteigerter Aldosteronsekretion (14, 15, 47, 55), Senkung dagegen zur Hemmung (16, 97). Die zona glomerulosa zeigt dabei morphologische und histochemische Veränderungen (59, 68, 84). Diese weisen bei vermehrtem Kaliumangebot auf eine gesteigerte Aktivität der Zellorganellen und eine Hypertrophie hin, welche bei Kaliummangel zur inversen Reaktion führen.

Wie kann der Einfluß des Kaliums auf die Biosynthese des Aldosteron erklärt werden? Wirkt es über extrazelluläre Konzentrationsveränderungen und moduliert membranständige Rezeptoren, ändert sich die intrazelluläre Kaliumaktivität und beeinflusst Enzymaktivitäten oder wird der Kaliumeffekt durch andere Mediatoren zur Wirkung gebracht?

Da der Kaliumgehalt der einzelnen Organe bei diätetischen Änderungen schwankt, liegt die Vermutung nahe, daß dem auch die NNR folgt und so die Aldosteronbiosynthese gesteuert werden könnte.

CANNON et al (21) vermuteten schon 1966, daß vermehrtes Kalium in den Zellen der zona glomerulosa die Aldosteronsekretion ansteigen läßt. Tatsächlich ließ sich von BAUMBER (8) 1971 zeigen, daß Kalium und andere Stimuli der Aldosteronsekretion den Kaliumgehalt der NNR erhöhten.

Flammenphotometrische Messungen an Zellen der zona glomerulosa der Ratte (16) und von Hunden (8, 69) bestätigten den Zusammenhang von Kaliumkonzentration und Höhe der Aldosteronsekretion. Mit der Atomabsorptionsspektrophotometrie konnte jedoch kein fester Zusammenhang zwischen intrazellulärer Kaliumkonzentration in Suspensionen von zona glomerulosa Zellen der Ratte und der Kortikosteronsekretion festgestellt werden (71, 79, 80). Diese Aussage wird durch Messungen mit der Elektronenstrahlmikroprobe an Kortexschnitten von Nebennieren der Ratte unterstützt (27, 102). Die Aldosteronbiosynthese wird jedoch eindeutig beim Schritt Cholesterin - Pregnenolon (82) und Desoxykortikosteron - Aldosteron (83) durch Kalium beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, durch Messungen an der lebenden Zelle klären zu helfen, welche Beziehung zwischen intrazellulärer Kaliumaktivität und Aldosteronsekretion besteht. Dazu werden K-selektive Elektroden und Ratten mit verschiedenen diätetischen Zuständen herangezogen.

2 METHODE

2.1 Auswahl, Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere

2.1.1 Tiere

Die zona glomerulosa ist bei Hund, Pferd und Schaf besonders gut ausgebildet und auch bei der Ratte noch gut zu sehen. Als Versuchstiere wurden deshalb männliche Sprague-Dawley-Ratten mit 140 - 160 g bei Anlieferung gewählt. In jedem Käfig befanden sich bei natürlichen Lichtverhältnissen und 20 - 22° C Raumtemperatur 4 bis 6 Tiere. Sie hatten freien Zugang zur Nahrung. Das Gewicht am Versuchstage lag in Abhängigkeit von der Diätdauer zwischen 160 und 260 g.

2.1.2 Diäten

Die Diäten sind in bezug auf ihren stimulierenden bzw. suppressiven Effekt auf die zona glomerulosa ausgesucht worden. Sie werden bei derartigen Versuchen allgemein verwendet. Standarddiät und natriumarme Diät stammen von der Firma Altromin, die übrigen Diäten wurden selbst hergestellt.

Der durchschnittliche Gehalt von Natrium und Kalium in den Diäten betrug (Mittelwert):

Standarddiät:	Natrium	0,2 %
	Kalium	1,0 %
Natriumarme Diät:	Natrium	0,03 %
	Kalium	0,23 %

Die einzelnen Diäten wurden folgendermaßen verabreicht:

Kontrolldiät:	Standarddiät tpt 1320	
	Leitungswasser	3-7 Tage
Natriumreiche Diät:	Standarddiät tpt 1320	
	0,9 % NaCl-Lösung	7 Tage
Natriumarme Diät:	Sonderdiät C 1036	
	Leitungswasser	21 Tage
Kaliumreiche Diät: (Lit: 14)	Standarddiät tpt 1320	
	Trinkflüssigkeit mit	
	5 % Glukose	
	300 mMol/l KCL	
	15 mMol/l NaCl	7 Tage

2.1.3 Operatives Vorgehen

Versuchsbedingungen sollten möglichst vergleichbar sein. Dazu gehört auch die Operationszeit. Diese lag in der Mehrzahl der Fälle zwischen 9.00 Uhr und 13.00 Uhr. Die Vergleichbarkeit ist durch den gleichen Tagesabschnitt weitest gegeben, auch schon durch die immer gleiche Vorgehensweise. Da eine inaktive Phase im zirkadianen Rhythmus der Ratte vorliegt, können jedoch Änderungen der Meßwerte innerhalb 24 Stunden nicht ausgeschlossen werden.

Die Betäubung der Tiere wurde mit 3 % Halothan binnen 3 - 5 Minuten eingeleitet, an die sich die Applikation von 1g Pentobarbital pro kg Körpergewicht in den Bauchraum anschloß. Mittels zweier seitlicher Schnitte wurden dann die Nebennieren an ihrem Bindegewebsstrang stumpf herausgetrennt. Nach der Befreiung von Fett- und Bindegewebsresten wurden sie dann bei 38° C in eine 3 %ige Agar-/Ringerlösung eingebettet. Durch Halbierung der erstarrten Agarblöcke und damit der Nebenniere entstanden vier Scheiben mit je einer halben Nebenniere, welche dann in kleinen Glasgefäßen mit je einem Milliliter Ringerlösung bei Zimmertemperatur inkubiert wurden.

Nach der Adrenalektomie erhielten die Versuchstiere eine Überdosis Pentobarbital.

Die Zeit zwischen Heraustrennen und Inkubation der Nebenniere betrug im Mittel 20 Minuten (n=25).

2.2 Meßmethoden

Mit den verschiedensten Methoden wie Elektronenmikroskopie, Elektronenmikroprobe, Atomabsorptionspektrophotometrie und ionenselektiven Mikroelektroden kann die Zellzusammensetzung analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Mikroelektroden verwendet, da sie im Vergleich zu anderen Maßverfahren ein einfaches Arbeiten an der lebenden Zelle ermöglichen.

2.2.1 Aufbau des Meßplatzes, Versuchsdurchführung

Der Versuch gliedert sich in zwei Abschnitte:

- 1) Die Bestimmung von kaliumselektiven und Zell-Potentialen mittels Mikroelektroden
- 2) Aldosteronbestimmung im Inkubationsmedium mittels Radioimmunoassay

Um nach dem Trauma der Adrenalektomie und Halbierung der Nebennieren eine der Diät entsprechende Basissekretion von Aldosteron zu erhalten, wurde das Inkubationsmedium der ersten halben Stunde verworfen. Nach einer und zwei Stunden wurden die jeweils neuen 1 ml Ringerlösung der vier Nebennierenhälften abgesaugt und bis zur Hormonbestimmung eingefroren gelagert. Eine Nebennierenhälfte diente der Punktion. Dazu wurde die zona glomerulosa mit dem Stereomikroskop (Leitz, Wetzlar) aufgesucht und mit einem Drahtgehäuse gegen elektrische Störfelder abgeschirmt, mittels eines Mikromanipulators (Leitz, Wetzlar) von Hand punktiert. Die getrennt bestimmten zell- und kaliumselektiven Potentiale fanden über einen hochohmigen Verstärker (Dual-Elektrometer, Modell F223A, W.P. Instruments Inc., New-Haven, Conn. USA) und einen Schreiber (Multi-Pen-Recorder, Modell DB-4, Tohshin Electron Co. LTD., Japan) ihre Dokumentation.

Im Durchschnitt gelang es, in der ersten und zweiten Stunde je 15 Zellpotentiale und kaliumselektive Potentiale aufzuzeichnen. Um reproduzierbare Meßergebnisse zu gewährleisten, wurden die kaliumselektiven Elektroden vor und nach ihrem Gebrauch geeicht und der Widerstand der Potentialelektroden bestimmt.

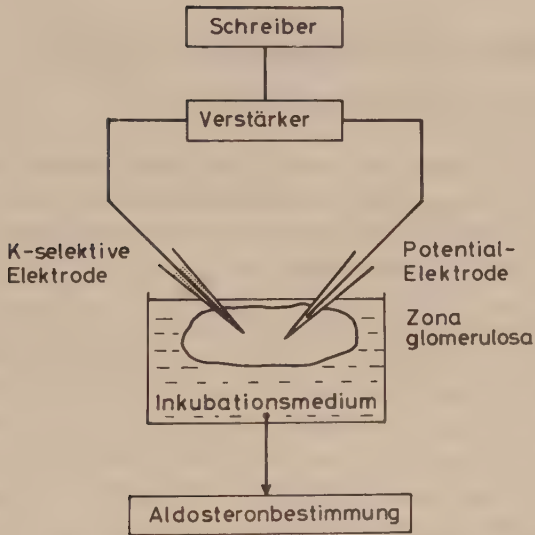


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau

2.2.1.1 Inkubationsmedium

Es wurde eine modifizierte Ringer-Lösung folgender Zusammensetzung benutzt:

NaCl	123,0 mMol/l
KCl	4,0 mMol/l
KH_2PO_4	1,0 mMol/l
MgSO_4	0,9 mMol/l
CaCl_2	1,7 mMol/l
NaHCO_3	28,0 mMol/l
Glukose·H ₂ O	5,13 mMol/l

Die Badtemperatur lag bei Zimmertermperatur zwischen 20° C und 22° C.

2.2.2 Messung mit ionenselektiven Elektroden

2.2.2.1 Kurzer historischer Überblick

Das Prinzip des Ionenaustausches ist seit dem vergangenen Jahrhundert bekannt (29). Flüssige Ionenaustauscher kannte schon CREMER 1906, der eine klassische Arbeit über Glaselektroden schrieb (zitiert in 20).

Die erste ionenselektive Elektrode war die pH-sensitive Glaselektrode, die erstmals 1954 intrazellulär angewendet werden konnte (19). Über die Entwicklung von Na^+ und K^+ sensitivem Glas gelang es dann auch, diese Ionen intrazellulär zu messen (53). Die punktierten Zellen mußten jedoch groß sein, da die sensitive Spitze der Elektroden zu lang war und sich deshalb leicht Meßfehler einstellten.

Verbesserungen an diesen Elektroden führten dann zu wirklichen "Mikroelektroden".

Die weitere Entwicklung führte über die "recessed tip configuration" (103) für Na^+ - und pH-Messungen zur Mikroelektrode mit flüssigen Ionenaustauschermembranen (105).

Nun konnten auch kleinste Zellen punktiert werden, da der Spitzendurchmesser bis zu kleiner als $1\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt werden kann.

Eine Vielzahl von biologisch und medizinisch interessanten Zellbestandteilen wie Na, K, Cl, Ca, Li, Mg u. a. ist so heute mit Mikroelektroden meßbar.

2.2.2.2 Messung der Ionenaktivität - theoretische Grundlagen

(Übersichtsarbeiten: 3, 34, 42, 46, 67, 87)

Die Nutzung ionensensitiver Mikroelektroden gestattet es, die in einer Zelle vorhandenen Ionen in bezug auf ihre "effektive Konzentration" zu messen. Das heißt, es wird die Aktivität der Ionen, die in Elektrolyttlösungen stets kleiner als die aktuelle Konzentration ist - und den aktuellen Zustand der Zelle bestimmt - gemessen. Sie ist durch einen Aktivitätskoeffizienten γ mit der Konzentration c des betreffenden Ions verbunden:

$$a_{\pm} = \gamma \cdot c \quad -1-$$

Da die Aktivität nur bei neutralen Ionenkombinationen thermodynamisch definiert und gemessen werden kann, bestimmt man eine mittlere Aktivität $a_{\pm}$ und einen mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}$ als geometrisches Mittel der theoretischen Einzelionenaktivitäten a_{+} (Aktivität des Kations) und a_{-} (Aktivität des Anions) und Einzelaktivitätskoeffizienten:

$$a_{\pm} = (a_{+} \cdot a_{-}) \quad -2-$$

Mit -1- folgt:

$$\gamma_{\pm} = (\gamma_{+} \cdot \gamma_{-}) \quad -3-$$

Für einen Teil der zwischenmolekularen Wechselwirkungen läßt sich der mittlere Aktivitätskoeffizient näherungsweise mit dem Debye-Hückelschen Gesetz berechnen

$$\log \gamma_{\pm} = - \frac{A |z_{+} \cdot z_{-}| \cdot \sqrt{I}}{1 + B \cdot a \cdot \sqrt{I}} + CI \quad -4-$$

wobei A und B die Debye-Konstanten, $\overset{\circ}{a}$ ein Maß für die Ionen-
größe, I die Ionenstärke, z^+ die Wertigkeit des Kations,
 z^- die Wertigkeit des Anions und C eine Konstante darstellen.
 $C \cdot I$ berücksichtigt die Konzentrationsabhängigkeit der Dielek-
trizitätskonstante.

Für den vorliegenden Fall mit einer Versuchstemperatur von
20° C wurden die Konstanten nach ROBINSON/STOKES folgender-
maßen gewählt (90):

$$\begin{aligned} A &= 0,507 \\ B &= 0,3282 \cdot 10^8 \\ C &= 0,055 \end{aligned}$$

Die Ionenparameter für Na und K sind nach BATES (7):

$$\begin{aligned} \text{Na} &= 4,5 \overset{\circ}{\text{\AA}} \\ \text{K} &= 3,0 \overset{\circ}{\text{\AA}} \end{aligned}$$

Für die Ionenstärke gilt nachstehende Formel:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 \quad -5-$$

Nun muß das Verhalten der ionenselektiven Elektroden bestimmt
und ein Ausdruck für die Berechnung des intrazellulären Kaliums
gefunden werden.

Allgemein lassen sich die mit Elektroden bestimmten Spannungen
mit der modifizierten Nernst-Gleichung (Nicolisky-Typ)
berechnen (56):

$$E = \text{const.} + \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{z_A \cdot F} \log \left(a_A + k_{A,B}^{\text{pot.}} \cdot a_B^{\frac{z_A}{z_B}} + k_{A,C}^{\text{pot.}} \cdot a_C^{\frac{z_A}{z_C}} + \dots \right) \quad -6-$$

Es stellen E die elektromotorische Kraft, R die Gaskonstante, T die Temperatur (°K), z_A , z_B , z_C die Wertigkeiten der Ionen A, B, C, F die Faraday-Konstante, a_A , a_B , a_C die Aktivitäten der Ionen A, B, C sowie $k_{A,B}$, $k_{A,C}$ die Selektivitätskonstanten für die Ionen B und C in Beziehung zum Ion A dar.

Gleichung -6- berücksichtigt alle Ioneneinflüsse auf die erzeugte Spannung und die Spannungen, die an Phasengrenzflächen entstehen. Für die intra- und extrazellulär hauptsächlich vorhandenen und hier interessierenden Ionen K^+ und Na^+ folgt:

$$E_K = \text{const.} + \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{z_K \cdot F} \log (a_K + k_{K,Na}^{\text{pot}} \cdot a_{Na}) \quad -7-$$

Bei nicht idealem Verhalten der Elektrode erhält man

$$E_K = \text{const.} + S \cdot \log (a_K + k_{K,Na}^{\text{pot}} \cdot a_{Na}) \quad -8-$$

Die Elektrodeneigenschaften sind durch Steigung S und Selektivitätskoeffizienten $k_{K,Na}^{\text{pot.}}$ festgelegt, welche durch

Messungen in zwei verschiedenen Eichlösungen bestimmt werden können.

Diese wurden bei den vorliegenden Messungen für Kaliumionen und Natriumionen zu jeweils 13 mMol/l und 130 mMol/l festgelegt.

Nach GUGGENHEIM sind die Aktivitätskoeffizienten der einzelnen Ionen sich und dem mittleren Aktivitätskoeffizienten gleich, so daß mit

$$\gamma_{\pm} = \gamma_{+} = \gamma_{-} \quad -9-$$

die Einzelaktivitäten von K^+ und Na^+ aus dem Debye-Hückelschen Gesetz gefolgert werden können.

Andererseits kann bei vorgegebener Aktivität die Konzentration der Eichlösung für das entsprechende Ion berechnet werden.

Die reelle Anstiegskonstante für reine Kaliumlösungen errechnet sich aus

$$\text{Eichlösung 1: } E_{K1} = \text{const.} + S_K \cdot \log a_{K1} \quad -10-$$

$$\text{Eichlösung 2: } E_{K2} = \text{const.} + S_K \cdot \log a_{K2} \quad -11-$$

$$\text{zu } S_K = \frac{E_{K2} - E_{K1}}{\log a_{K2} - \log a_{K1}} = \frac{\Delta E_K}{\Delta \log a_K} \quad -12-$$

Ebenso folgt für die Anstiegskonstante in NaCl-Lösungen:

$$S_{Na} = \frac{\Delta E_{Na}}{\Delta \log a_{Na}} \quad -13-$$

Im Idealfall sollten

$$S_K = S_{Na} = \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{z_A \cdot F} \quad -14-$$

sein.

Die Selektivitätskonstante wird nun in zwei gleichwertigen Lösungen von Meßion K und Störion Na bestimmt, wobei der Therm const. als nicht veränderbar und gleich angesehen wird (67):

$$E_K = \text{const.} + S_K \cdot \log a_K \quad -15-$$

$$E_{Na} = \text{const.} + S_{Na} \cdot \log k_{K,Na} \cdot a_{Na} \quad -16-$$

Mit $a_K = a_{Na}$ folgt:

$$k_{K,Na} = 10 \exp \left(\frac{E_{Na}}{S_{Na}} - \frac{E_K}{S_K} \right) \quad -17-$$

Die Aktivität des interessierenden K-Ions in der Zelle wird nun durch Spannungsmessungen in der Badlösung und in der Zelle mit ionenselektiven Elektroden und durch Membranpotentialmessungen mit KCl-gefüllten Glaselektroden bestimmt.

$$E_{K,Bad} = \text{const.} + S_K \cdot \log (a_{K,Bad} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,Bad}) \quad -18-$$

$$E_{K,Zelle} = \text{const.} + S_K \cdot \log (a_{K,Zelle} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,Zelle}) + E_M \quad -19-$$

$$E = S_K \left(\log \frac{a_{K,Z} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,Z}}{a_{K,B} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,Z}} \right) + E_M \quad -20-$$

E_M ist das mit Potentialelektroden gemessene Membranpotential.

$$a_{K,Z} = (a_{K,B} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,B}) \cdot 10 \exp \frac{\Delta E - E_M}{S_K} - k_{K,Na} \cdot a_{Na,Z} \quad -21-$$

Das Endglied $k_{K,Na} \cdot a_{Na,Z}$ kann auf Grund der kleinen Selektivitätskonstante und der geringen intrazellulären Natriumaktivität $a_{Na,Z}$ entfallen, wodurch man die Endformel in Anlehnung an WALKER (105) erhält:

$$a_{K,Zelle} = (a_{K,Bad} + k_{K,Na} \cdot a_{Na,Bad}) \cdot 10 \exp \frac{E_{K,Zelle} - E_{K,Bad} - E_M}{S_K} \quad -22-$$

Mit ihr wurden dann die intrazellulären Kaliumaktivitäten mittels eines Tischrechners (HP 97, Hewlett - Packard) berechnet.

Die dazu notwendigen Aktivitäten von Natrium und Kalium in der Badlösung ergaben sich über die Berechnung der entsprechenden Aktivitätskoeffizienten nach Gleichung -4-.

$$\text{Mit } C_{K,B} = 5,62 \text{ mMol/l}$$

$$C_{Na,B} = 167,2 \text{ mMol/l}$$

$$\text{und } \gamma_{K,B} = 0,7209$$

$$\gamma_{Na,B} = 0,7538$$

$$\text{folgt: } a_{K,B} = 3,979 \text{ mMol/l}$$

$$a_{Na,B} = 126,0 \text{ mMol/l}$$

2.2.2.3 Herstellung und Eigenschaften kaliumselektiver Elektroden

Die ionenselektiven Elektroden wurden aus Borosilikatglas der Firma Hilgenberg, Malsfeld, hergestellt, welches einen inneren Durchmesser von 0,58 mm, einen äußeren Durchmesser von 1 mm und einen inneren Vollglasfaden besaß. Die Glasröhrchen wurden mittels einer Heizplatte für eine Stunde auf 300° C erhitzt und dann zu Mikroelektroden vertikal ausgezogen (Ziehgerät von David Kopf Instr., Modell 700C).

Um dem Ionenaustauscher Halt zu geben, mußte das Innere der Elektrodenspitze hydrophobe Eigenschaften erhalten. Das konnte durch 3 - 5 sec Eintauchen der Spitze in ein Gemisch aus 10 µl Dow-Corning 1107 und 5 ml Azeton und anschließendes Erhitzen der Kapillaren auf 100° C für 15 Minuten erreicht werden. Der kaliumselektive Ionenaustauscher (Corning Code 477317), wie anschließend die Referenzlösung von 0,5 MolKCl/l, wurden dann vom dicken Ende der Glaselektrode her eingefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte senkrecht in einer 150 mMol/l KCl-Lösung 12 Stunden bis zur Messung.

Durch die Eichung vor und nach dem Messen wurde gewährleistet, daß zur Berechnung der intrazellulären Aktivitäten nur Potentiale solcher Elektroden verwendet wurden, deren Selektivitätskonstante sich nicht wesentlich verändert hatte und kleiner als 0,01 war. Die Elektrodeneigenschaften lassen sich wie folgt charakterisieren:

Spitzendurchmesser	$\leq 0,5 \mu\text{m}$	n = 47
Widerstand	10 - 30 G Ohm	
Steilheit	$60,1 \pm 4 \text{ mV}$	
Spitzenpotential	$\leq -5 \text{ mV} $	
Selektivitätskonstante	$0,01 \geq k_{\text{K}/\text{Na}} \geq 0,001$	

Der Widerstand wurde bei 1 Nanoampere gemessen, die Steilheit mit zwei Kalium-Chlorid-Eichlösungen von 13 mMol/l und 130 mMol/l Aktivität bestimmt.

2.2.3 Messung der Zellpotentiale

Elektroden zur Membranpotentialmessung wurden ebenfalls aus dem schon beschriebenen Glas hergestellt. Nach dem Ziehen mit einer Referenzlösung von 0,5 Mol KCl/l gefüllt, wurden sie in einer feuchten Kammer horizontal bis zum Meßvorgang kurzfristig aufbewahrt. Ihr Widerstand gegenüber Gleichstrom (10^{-9} A) und 0,5 Mol KCl/l als Eichlösung betrug im Mittel 20 - 50 M Ohm, einem Spitzendurchmesser kleiner als $0,5 \mu\text{m}$ entsprechend. Da nach ADRIAN das Spitzenpotential einer Potentialelektrode ein Hauptindiz für deren Güte ist (1), wurden nur solche verwendet, bei denen es kleiner als $|-5| \text{ mV}$, wiederum in 0,5 Mol KCl/l als Eichlösung, war.

Eine exakte Potentialmessung ist dann durch eine schnelle Potentialänderung von Null auf den Membranpotentialwert, Persistieren für mindestens 5 sec, und nach dem Herausziehen der Elektrode wieder Abfall auf Null Millivolt, gekennzeichnet.

2.2.4 Aldosteronbestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA) (Methode nach 10)

Es wurde die ins Inkubationsmedium von 1 ml stündlich sekretierte Aldosteronmenge bestimmt. Die Lösung blieb bis zur Messung eingefroren aufbewahrt. Die Messung erfolgte durch einen direkten Radioimmunoassay (Universitätsklinikum Steglitz, Abteilung für Innere Medizin mit Schwerpunkt Endokrinologie).

Durch Voruntersuchungen mit Inkubationslösungen von Kontrolltieren mit a) Papierchromatographie und anschließendem Radioimmunoassay und b) Radioimmunoassay alleine konnte gezeigt werden, daß kein Unterschied in der Aussagefähigkeit besteht. Mit beiden Verfahren wurden jeweils 20 Proben untersucht. Die Kombination von Chromatographie und Assay ergab einen Mittelwert von $4,3 \text{ ng/ml/h}$, $\text{SD} = 1,6$, der alleinige Radioimmunoassay lie-

ferte einen Wert von 4,6 ng/ml/h, SD = 1,9.

Das Signifikanzniveau war damit größer als 0,05, so daß die eigentlichen Messungen ohne Papierchromatographie durchgeführt werden konnten.

Dazu trägt das hochspezifische Aldosteron-Antiserum bei (National Institute of Health, Bethesda M.D., USA). Seine Kreuzreaktion mit dem Hauptmetaboliten Corticosteron der Rattennebennierenrinde beträgt nur 0,31 % (92).

Für die Bestimmung der Aldosteronsekretion wurden 0,1 ml Inkubationsmedium in ein RIA-Röhrchen pipettiert, in das ausserdem 0,1 ml 1,2- H^3 -markiertes Aldosteron (80 - 105 Ci/mMol, bezogen von Amersham), 0,65 ml Antiserum und Albumin-Phosphat-Puffer gegeben wurden, so daß ein Gesamtvolumen von 0,9 ml resultierte.

Nach intensivem Mischen erfolgte dann die Inkubation der Röhrchen bei 4° C für 10 Stunden. Danach wurden 0,1 ml Charcoal-Dextran-Suspension hinzugefügt, durchmischt und zentrifugiert. Dabei sedimentiert das freie Aldosteron, die Aldosteron-Antikörperkomplexe bleiben im Überstand. Der Überstand wurde dekantiert und in Zählfläschchen, die 7 ml Szintillationslösung enthielten, gefüllt. Die Messung der Aktivität erfolgte im Szintillationsmeßgerät (Liquid-Scintillation-Spectrometer R 456, Firma Packard).

Mit dem gleichen Verfahren wurden Standard- und Leerwerte bestimmt. Die Auswertung erfolgte dann mit Hilfe eines Programmes am IBM-1800 Rechner.

2.3 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung der in den einzelnen Versuchsgruppen gemessenen Meßdaten wurde, da die Normalverteilung bei biologischen Experimenten eher die Ausnahme ist, der Wilcoxon-U-Test für unverbundene Zufallsstichproben angewendet. Für das Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ ausgewählt.

Mittelwerte und Standardabweichung sind angegeben.

Die Berechnung erfolgte mittels eines Programmes (Institut für Medizinische Informatik des Universitätsklinikums Steglitz der Freien Universität Berlin) mit einem Tischrechner (Wang 2200-PCS II).

3 ERGEBNISSE

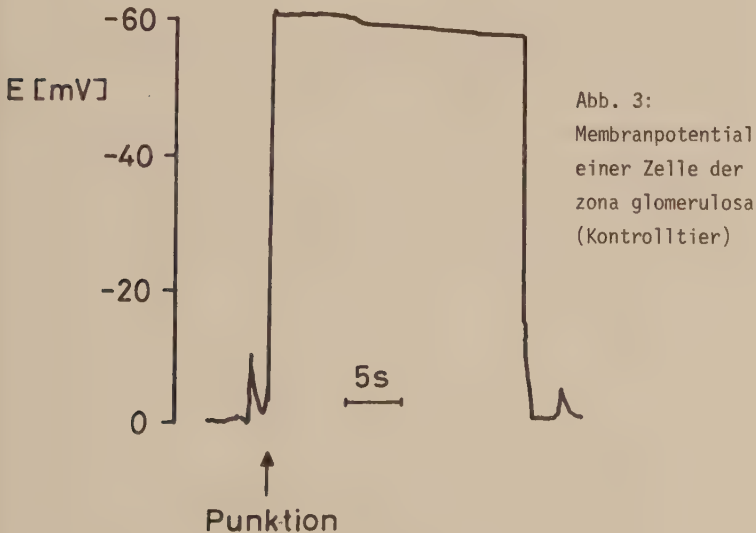
3.1 Membranpotentiale

Die Punktion der Glomerulosazellen bereitete einige Schwierigkeiten, da die Zellen, wie bereits erwähnt, relativ klein sind.

Wie auch bei den K^+ -Aktivitätsmessungen, gelang die Zellpunktion am besten, wenn die Elektrode zentrifugal unter einem Winkel von etwa 45° am Übergang zona fasciculata - zona glomerulosa aufgesetzt und dann in Richtung zur äußeren Kapsel bewegt wurde. Die Zellpotentiale bleiben, wenn die Zelle nicht verletzt ist, über Minuten konstant und konnten auch noch nach Stunden abgenommen werden.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen bleiben die Zellen also weithin lebensfähig und aktiv.

Originalregistrierung und die einzelnen Werte werden im folgenden angegeben:



3.1.1 Zellpotentiale der zona glomerulosa von Kontrolltieren

Bei einer Anzahl von Versuchen wurden die Membranpotentiale über mehrere Stunden nach Inkubation registriert. Dabei zeigte sich eine weitgehende Konstanz innerhalb der ersten drei Stunden. Die mittleren Werte ergaben -59,5 mV in der ersten Stunde, -60,9 mV in der zweiten und -60,7 mV in der dritten Stunde. Da statistisch keine zu berücksichtigenden Unterschiede zwischen erster und zweiter Stunde bestehen, sind deren Werte zusammengezogen und ein Vergleichswert mit -60 mV als Membranpotential der Kontrolltiere angegeben.

Tabelle 1: Membranpotentiale der zona glomerulosa von Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert, Standardabweichung) ($p > 0,05$ für den Vergleich aller Stunden)

Zeit (h)	E (mv)	SD	n
1.	-59,5	7,2	35
2.	-60,9	6,4	21
3.	-60,7	6,9	44
1. + 2.	-60,0	6,8	56

3.1.2 Zellpotentiale der zona glomerulosa diätetisch belasteter Tiere

Da die Potentialwerte der ersten beiden Stunden eines Versuches statistisch nicht verschieden waren, konnte auch hier von einer Konstanz in den betrachteten 2 Stunden ausgegangen und ein Vergleichswert zusammen für die 1. und 2. Stunde berechnet werden.

Tabelle 2: Membranpotentiale der zona glomerulosa diätetisch belasteter Tiere in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
(Mittelwert, Standardabweichung)

Zeit (h)	Na-reich E (mV)	Na-arm E (mV)	K-reich E (mV)
1.	-58,5 $\pm$ 6,8 n = 14	-56,4 $\pm$ 5,0 n = 24	-55,9 $\pm$ 6,1 n = 34
2.	-57,1 $\pm$ 6,6 n = 10	-58,6 $\pm$ 6,3 n = 19	-57,2 $\pm$ 6,9 n = 38
1. + 2.	-57,9 $\pm$ 6,6 n = 24	-57,4 $\pm$ 5,9 n = 43 *	-56,4 $\pm$ 6,4 n = 72 *

* $0,05 \geq p \geq 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen

Für Tiere mit K-reicher Diät ergaben sich z. B. für die erste Meßstunde -55,9 mV und für die zweite Stunde -57,2 mV. Der gemeinsame Wert von erster und zweiter Stunde liegt damit bei -56,4 mV.

Für die Addition von erster und zweiter Stunde erhält man bei natriumreicher Diät -57,9 mV, bei natriumarmer Diät -57,4 mV. Die geringere Punktionszahl bei Na-reicher Diät deutet auf die Schwierigkeiten hin, stabile Potentiale zu erhalten.

Verschmälerung der zona glomerulosa und Verkleinerung ihrer Zellen können eine Erklärung liefern. Der Potentialverlauf einiger Punktionen (Abb. 4) zeigt ein unter dem Spitzenwert liegendes Plateau im Vergleich zu den Kontrollwerten und Werten bei den anderen Diäten. Dies gibt Veranlassung, anzunehmen, daß der angegebene Mittelwert für natriumarme Diät etwas zu niedrig ist und in Wirklichkeit eher die Größe des Membranpotentials von Kontrolltieren hat.

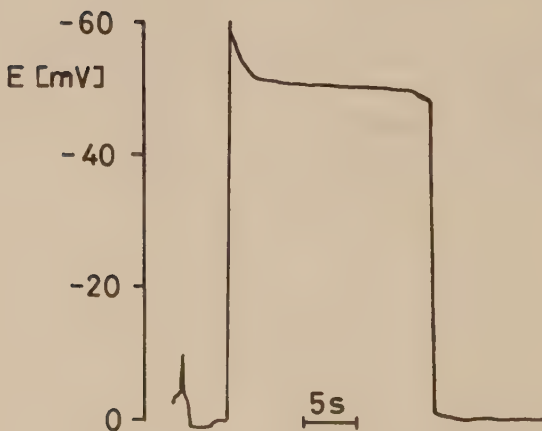


Abb. 4:
Membranpotential
der zona
glomerulosa
bei natriumreicher
Diät

3.2 Intrazelluläre Kaliumaktivität

Folgender Kurvenverlauf charakterisiert die intrazelluläre Potentialantwort, die nach Punction mit K^+ -sensitiven Elektroden aufgezeichnet werden konnte:

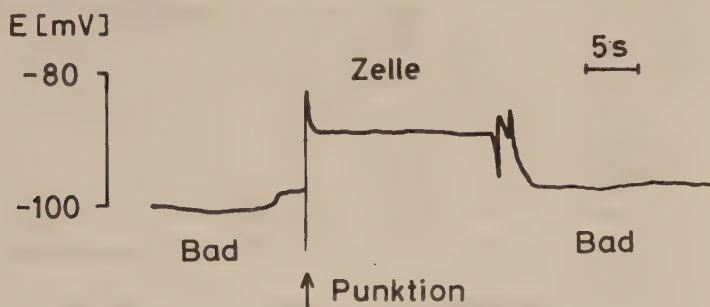


Abb. 5: Intrazelluläres, kaliumselektives Potential der zona glomerulosa

Die negative Spitze zum Zeitpunkt der Penetration zeigt kurzfristig das Zellmembranpotential an (nicht vollständig auf Grund der Trägheit des Schreibers), da sich das K^+ -Potential der Elektrode erst aufbauen muß. Konstanz des Potentials über mindestens 10 s und ein sich schnell einstellendes Plateau galten als Gütekriterien der Messung.

Im Gegensatz zu den Membranpotentialmessungen gestalteten sich die Messungen der K^+ -Potentiale für die Aktivitätsbestimmungen weitaus schwieriger. Neben dem in Abb. 5 gezeigten eindeutigen Punctionserfolg gab es eine Reihe von Kurvenverläufen, wie in Abb. 6 dargestellt:

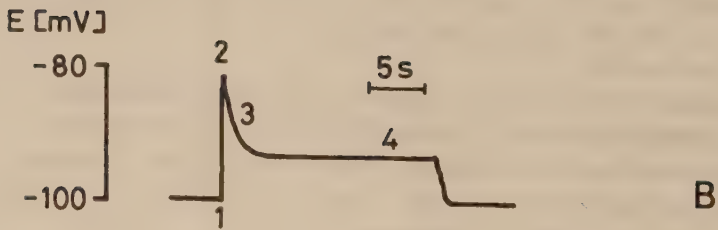
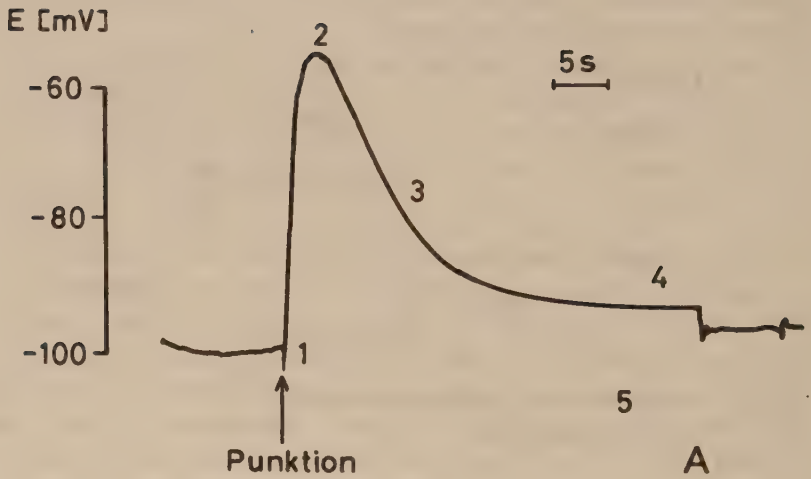


Abb. 6: Verschiedene Verläufe intrazellulärer Kaliumpotentiale

Sie zeigen, daß nicht sofort eine konstante Spannung erreicht wird. In Abbildung 6A deutet die negative Spitze bei 1 das schon erwähnte kurzzeitig sichtbare Membranpotential und damit die gelungene Punktion der Zelle an.

Daraufhin erscheint jedoch mit 2 ein starkes Abfallen des kaliumselektiven Elektrodenpotentials mit anschließendem langsamen Wiederanstieg 3 und einem späten Plateau 4.

Diese Art Potentialverlauf ist zu undefiniert, um bei der Auswertung Berücksichtigung zu finden, zumal die Berechnung der Aktivität mit dem Potential der Phase 2 einen völlig unrealistischen Wert, z. B. bei Kontrollen, von 216,76 mMol/l, einer Konzentration von 300,68 mMol/l entsprechend, ergibt.

Eine Kurvenform wie in Abbildung 6B ist auswertbar.

Der Potentialabfall in 2 ist geringer, ebenso die Anstiegszeit der Phase 3 zum konstanten Wert bei 4.

Durch die sich früh einstellende Plateauphase ist es gerechtfertigt, solche Kurven für die Berechnung der Kaliumaktivität heranzuziehen.

Anhand der verschiedenen Punktionsergebnisse verdeutlichen sich die Schwierigkeiten und Grenzen der intrazellulären Aktivitätsmessungen mit Mikroelektroden. Einerseits hängt die Genauigkeit von der Güte der Elektroden und der punktierten Zellart ab, andererseits von der Auswertung, die subjektiven Spielraum zuläßt.

Da die geschilderten Spannungsverläufe in anderen Geweben wie Korneaepithel (51), Gallenblasenepithel (109) und Purkinjefasern (108) nicht beobachtet wurden, scheint die Zellart der zona glomerulosa dafür verantwortlich zu sein. Der relativ lipophile Zellinhalt mit dem großen Zellkern wirkt sich wahrscheinlich stärker auf den Aufbau der Phasengrenzfläche Zytoplasma - Ionenaustauscher im Sinne einer Verzögerung aus.

Nicht zuletzt kann durch die Panktion eine Veränderung des Widerstands-Kapazitätsverhältnisses des Ionenaustauschers und damit der Anstiegssteilheit eintreten, ohne daß die Selektivitätskonstante wesentlich verändert wird.

Diese Überlegungen führten dazu, daß nur Potentialkurven der Art wie in Abb. 5 und Abb. 6B zur Berechnung verwendet wurden. Damit ergaben sich, getrennt nach Diäten, folgende Werte:

Tabelle 3: Intrazelluläre Kaliumaktivitäten in Abhängigkeit von Zeit und Diät (Mittelwert, Standardabweichung)

Zeit (h)	Kontrollen (mMol/l)	Na-reich (mMol/l)	Na-arm (mMol/l)	K-reich (mMol/l)
1.	63,1 $\pm$ 8,2 n = 34	60,6 $\pm$ 2,5 n = 14	59,6 $\pm$ 10,1 n = 42	57,5 $\pm$ 7,3 + n = 36
2.	53,4 $\pm$ 6,6 n = 41 ***	57,5 $\pm$ 4,1 n = 38 *	59,4 $\pm$ 7,2 n = 27 +++	59,3 $\pm$ 10,3 n = 42 +++
3.	57,5 $\pm$ 2,5 n = 20	48,9 $\pm$ 2,7 n = 28		50,0 $\pm$ 6,8 n = 14
1.+2.	57,8 $\pm$ 7,9 n = 95	58,4 $\pm$ 3,9 n = 52	59,5 $\pm$ 9,5 n = 69	58,5 $\pm$ 9,0 n = 78

* $0,05 \geq p \geq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

= Signifikanzniveau zwischen
1. und 2. Stunde

+ $0,05 \geq p \geq 0,01$

+++ $p \leq 0,001$

= Signifikanzniveau zwischen Diät
und Kontrollen innerhalb der
gleichen Stunde

Die Ergebnisse der ersten und zweiten Versuchsstunde wurden wieder auf ihre Verteilungsunterschiede geprüft. Bei zweiseitiger Testung ergaben Na-arme und K-reiche Diät für $p \leq 0,05$ keine Signifikanz zwischen erster und zweiter Stunde.

Na-reiche Diät zeigte eine Signifikanz zwischen beiden Stunden für $p \leq 0,05$.

Die Kontrollwerte fallen jedoch in der zweiten Stunde stark ab, um in der dritten Meßstunde wieder anzusteigen.

Berücksichtigt man den generellen Abfall der Aktivitäten in der dritten Stunde, müssen die Werte der zweiten Meßstunde für Kontrollen infolge biologischer Parameter und Meßschwankungen als zu niedrig bestimmt betrachtet werden.

Die Mittelwerte mit ihren Unterschieden von einigen mMol/l, die statistische Untersuchung und die Berücksichtigung der Streubreite des Meßverfahrens gestatten es auch hier, Mittelwerte zusammen für die ersten beiden Meßstunden zu berechnen. Im Falle der Kontrollen wurde über alle drei Stunden gemittelt.

Ein Vergleich der einzelnen Mittelwerte der Gruppen zeigt dann keine Abhängigkeit der intrazellulären Kaliumaktivität von der verabfolgten Diät. Dies gilt sowohl in bezug auf die Kontrollwerte als auch zwischen den einzelnen Diätgruppen ($p > 0,05$).

Auch für die erste Stunde allein ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der Diätgruppen zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Eine Ausnahme bildet die Gruppe mit kaliumreicher Diät, bei der $0,05 > p > 0,01$ ist.

Unter Würdigung aller Umstände kann zusammenfassend gesagt werden, daß verschiedene diätetische Regime die intrazelluläre, zytoplasmatische Kaliumaktivität nicht verändern. Sie liegt für Kontrollen bei 57,8 mMol/l, bei natriumreicher Diät um 58,4 mMol/l, natriumarmer Diät um 59,5 mMol/l und schließlich kaliumreicher Diät bei 58,5 mMol/l.

3.3 Aldosteronsekretion

Ein interessantes Ergebnis, welches mit den Ruhemembranpotentialmessungen und den Aktivitätsbestimmungen des interzellulären Kaliums positiv korreliert, ist die gleichbleibende Aldosteronsekretion über vier Stunden. Der statistisch nicht relevante Abfall von 4,5 ng/ml der ersten Versuchsstunde auf 4,3 ng/ml der zweiten ($p > 0,05$) erlaubt es, die Aldosteronsekretion beider Stunden zusammenzufassen. Die Aldosteronproduktion der Nebennierenhälfen von Kontrolltieren erhält somit den Wert von 4,4 ng/ml/Stunde.

Tabelle 4 gibt das zeitliche Verhalten wieder:

Tabelle 4: Aldosteronsekretion der Nebennierenhälfen
von Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Zeit
(Mittelwert, Standardabweichungen)
 $p > 0,05$ für den Vergleich aller Stunden

Zeit (h)	Aldosteronsekretion (ng/ml)	SD	n
1.	4,5	2,2	22
2.	4,3	1,5	23
3.	4,7		7
4.	4,9		10
1. + 2.	4,4	1,9	45

Die Aldosteronsekretion der Nebennierenhälften von diätetisch behandelten Tieren zeigte ebenfalls über zwei Stunden keinen zu berücksichtigenden Unterschied ($p > 0,05$), so daß wiederum Vergleichswerte von erster und zweiter Stunde des Versuches gebildet werden konnten.

Tabelle 5 zeigt die Werte bei verschiedenen Diäten.

Tabelle 5: Adolsteronsekretion der Nebennierenhälften in Abhängigkeit von Diät und Zeit (Mittelwert, Standardabweichung)
 $p < 0,001$ für alle Werte gegenüber Kontrollen

Zeit (h)	Na-reiche Diät (ng/ml)	Na-arme Diät (ng/ml)	K-reiche Diät (ng/ml)
1.	1,7 $\pm$ 0,6 n = 8	10,3 $\pm$ 4,3 n = 14	11,8 $\pm$ 6,3 n = 20
2.	1,5 $\pm$ 0,6 n = 8	11,4 $\pm$ 4,6 n = 16	11,2 $\pm$ 5,9 n = 20
1+2.	1,6 $\pm$ 0,6 n = 16	11,0 $\pm$ 4,5 n = 30	11,5 $\pm$ 6,0 n = 40

Sie zeigen das theoretisch erwartete Verhalten. Na-reiche Diät senkt die Aldosteronsekretion, Na-arme und K-reiche Diät erhöhen sie. Es besteht bei allen Diäten Signifikanz gegenüber den Kontrollen ($p < 0,001$).

3.4 Ergebnisse im Überblick

E [mV]

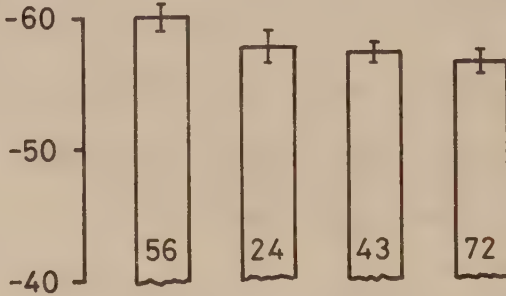


Abb. 7:
Membranpotentiale
in Abhängigkeit
von der Diät

a_k^i [mMol/l]



Abb. 8:
Kaliumaktivität
in Abhängigkeit
von der Diät

Aldosteron [ng/ml/h]

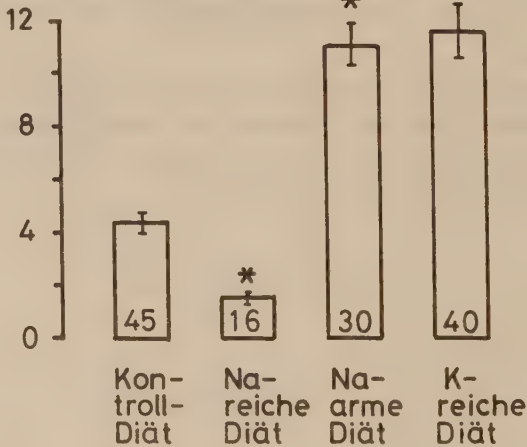
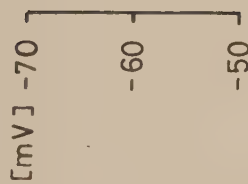


Abb. 9:
Aldosteronsekretion
in Abhängigkeit
von der Diät

(* $p \leq 0.001$)

(Mittelwerte der 1. + 2. h, SEM, Anzahl der Messungen)

Membran-
potential ●



Aldosteron-
sekretion ○

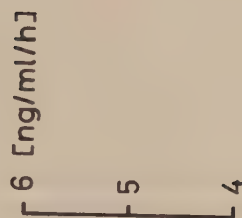


Abb. 10: Membranpotential und Aldosteronsekretion
in Abhängigkeit von der Zeit

4 DISKUSSION

4.1 Membranpotentiale

Die Nebenniere ist elektrophysiologisch relativ gering untersucht. Erste Ansätze stammen jedoch schon aus dem Jahre 1959, in dem eine Änderung des "Elektrogrammes" der Nebenniere bei ACTH-Injektionen in Verbindung mit der Kortikosteroidproduktion gebracht wurde (63). Messungen mit Mikroelektroden ergaben dann Ruhemembranpotentiale der Nebennierenrinde von verschiedenen Spezies. Für die zona fasciculata der Ratte wurden -70,5 mV angegeben (76). Ein Zusammenhang zwischen Membranpotential und Kortikosteroidproduktion konnte jedoch nicht beobachtet werden. So änderte Erniedrigung des Ruhemembranpotentials durch extrazelluläre Kaliumerhöhung nicht die Kortikosteroidproduktion, während ACTH-Gabe das Membranpotential nicht veränderte, dafür jedoch die Kortikosteroidsekretion ansteigen ließ (77).

Weitere Experimente dieser Gruppe zeigten bei kaliumfreien Inkubationsmedien mit dadurch erhöhtem Membranpotential keine Änderung der Kortikosteronausbeute und keine Änderung der Antwort auf ACTH gegenüber Kontrollen.

ACTH senkte in diesem Medium aber rapide das Zellmembranpotential (78).

Diese unphysiologischen Bedingungen lassen keine allgemeine Aussage über die Beziehung zwischen ACTH, Membranpotential und Kortikosteronsekretion zu. ACTH scheint jedoch einen Einfluß auf die Permeabilität und das Membranpotential zu besitzen, welcher bei normalen K^+ -Konzentrationen nicht meßbar ist (78).

Beweise für den Zusammenhang zwischen Membranpotential und Aldosteronsekretion werden in einer neueren Arbeit mit Nebennieren von Katzen angeführt (86). Ruhemembranpotentiale werden für die zona glomerulosa mit $-67,4$ mV und für die zona fasciculata-recitularis mit $-72,8$ mV angegeben. Stimulation mit Angiotensin II oder Kaliumerhöhung im Bad depolarisierte die Zellen der zona glomerulosa und erhöhte die Ausschüttung von Aldosteron. Unphysiologisch hohe Dosen lassen auch hier weitere Untersuchungen ratsam erscheinen.

Das mit der vorliegenden Arbeit gefundene Membranpotential von -60 mV bei Kontrolltieren liegt in der Größenordnung des bei der Katze gefundenen. Da keine weiteren Vergleiche vorliegen, ist anzunehmen, daß der geringere Wert bei der Ratte durch Speziesunterschiede und verschiedene Versuchsbedingungen (Temperatur, Inkubationsmedium, Tieralter) zustande kommt.

Diätetische Belastung und damit veränderte Aldosteronsekretion hat keinen Einfluß auf das Membranpotential. Dessen leichtes Absinken bei Na-armer und K-reicher Diät kann nicht die Verdoppelung der Aldosteronsekretion erklären, ebenso nicht seine Verminderung bei natriumreicher Diät, auch wenn die Statistik eine Signifikanz erkennen läßt. Die Ergebnisse an der zona glomerulosa der Katzennebennierenrinde (86) konnten mit dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Welche Mediatoren ursächlich Veränderungen des Membranpotentials bewirken, kann hier nicht diskutiert werden, da diätetische Behandlung die Summe aller die Aldosteronsekretion beeinflussen Faktoren auf die Nebennierenrinde einwirken läßt. In Zusammenhang mit der Feststellung, daß kortikale Zellen ihre Syntheseprodukte nicht speichern, sind Potential- sowie Permeabilitätsänderungen keine primären Bedingungen für deren Freisetzung sondern eher Folge der stimulierenden Faktoren (31, 77).

4.2 Intrazelluläres Kalium

4.2.1 Indirekte Hinweise auf die Rolle des kortikalen Kaliums

Der Einfluß von Kalium auf die Aldosteronproduktion und -freisetzung wird seit langem untersucht, so daß eine Vielzahl, zum Teil widersprüchliche Arbeiten existieren.

Daß Kalium eine Voraussetzung für die Proteinbiosynthese ist und auch einen Einfluß auf frühe und späte Schritte der Aldosteronsynthese ausübt, wurde schon erwähnt und ist allgemein anerkannt. Dies erklärt jedoch nicht die Art und den Ort der Einflußnahme.

Der Gedanke, daß lokale Veränderungen der Na-K-Balance in der Nebennierenrinde die Steroidsekretion beeinflussen, wurde schon früh geäußert (28).

Aber auch die Möglichkeit, daß Kalium an einem intrakraniellen Ort angreift, wurde beschrieben, da Kaliuminfusionen in die Arteria carotis anästhesierter Hunde den Serumaldosteronspiegel erhöhten (47).

Die meisten Arbeiten beschäftigen sich jedoch mit dem Wirkungsmechanismus in der Nebennierenrinde.

So wurde die selektive Sensitivität der zona glomerulosa zu Kaliumionen in Verbindung zu speziellen Kalium-Rezeptoren an der äußeren Zellmembran gebracht (107). Extrazelluläre Kaliumschwankungen würden danach über einen Membranmechanismus die Steroidbiosynthese steuern. Weitere Untersuchungen zu diesen "Kaliumrezeptoren" liegen jedoch nicht vor, so daß ihre Existenz fraglich bleibt.

Hauptsächlich in der zona glomerulosa befindliche Angiotensin II-Rezeptoren wurden allerdings gefunden (32). Sie erhöhen ihre Sensitivität gegenüber Angiotensin II bei steigender Kalium-Plasmakonzentration (43) und nehmen an Zahl zu (30). Somit wirkt Kalium als Regulator spezieller Hormonrezeptoren und damit über das c-AMP. Aber auch eine davon unabhängige, direkte Wirkung von Kalium wurde beobachtet.

Die meisten Hinweise auf die Rolle des kortikalen Kaliums sind indirekter Art. So beeinflusst die Serum-Kalium-Balance, wie schon erwähnt, die Biosynthese des Aldosteron. Hyperosmolare Infusionen von NaCl oder Mannitol verringern die Aldosteronsekretion bei steigendem Plasmakalium. Geschieht dies, wie vermutet, durch einen zellulären Kaliumausstrom, muß das intrazelluläre Kalium eine wichtige Rolle spielen, zumal Kaliuminfusionen den Plasma-Aldosteronabfall durch Dextran verhindern kann, ohne die Plasmakonzentration von Kalium zu verändern (12).

In vitro-Versuche mit Zellen der zona glomerulosa geben ebenfalls Aufschluß über den Einfluß von Kalium.

Beim Kaninchen steigen Sensitivität und Aldosteronantwort auf die Stimuli Angiotensin II und ACTH bei Konzentrationserhöhung von Kalium im Badmedium. Dabei findet der Synergismus von Angiotensin II und Kalium distal der Bindung von Angiotensin II an seine Rezeptoren statt, was auf einen intrazellulären Mechanismus hindeutet (43).

Ebenfalls intrazelluläres Kalium wird als wichtig für die Wirkung von Angiotensin II und ACTH bei der Ratte angesehen (17) sowie bei der Umwandlung von Desoxykortikosteron zu Aldosteron (54).

Glomerulosazellen des Hundes zeigten nach Angiotensin II-Behandlung keine Kalium-Konzentrationsänderungen, wenn der Kaliumgehalt der Schnitte flammenphotometrisch gemessen und der intrazelluläre Raum berechnet wurde.

Da jedoch Quabain einen hemmenden Effekt auf die intrazelluläre Kaliumkonzentration und den stimulierenden Einfluß von Angiotensin II auf die Aldosteronsynthese hatte, wird vom Einfluß des Kaliums auf diese geschlossen, auch wenn Angiotensin II selbst den Eintritt von Kalium in die Zellen nicht vermehrte (45).

Der Einfluß von Kalium wird jedoch auch relativiert bzw. in Frage gestellt. So spielt das Plasma-Kalium nur eine geringe Rolle bei der streßinduzierten Plasma-Aldosteronschwankung (39). Ebenfalls in vivo, beim normalen Hund, zeigten Volumenveränderungen einen wesentlich stärkeren Einfluß auf die Aldosteronsekretion als Plasmakaliumschwankungen. Hypovolämie übertrifft den aldosteronstimulierenden Effekt der Hypokaliämie (88).

Eher soll Kalium auf Kalziumfluxe in die Glomerulosazellen wirken, da Kalzium mit der Steroidsynthese verbunden ist und mehr als intrazelluläres Kalium für deren Kontrolle verantwortlich sei (72).

4.2.2 Ergebnisse bei direkter Bestimmung von Kalium in der zona glomerulosa

Erste flammenphotometrische Messungen an der ganzen Nebennierenrinde des Schweines zeigten eine Hemmung der Kaliumakkumulation durch Angiotensin II in vitro (101). Auch Quabain senkte das Gewebe-Kalium der Nebennierenrinde, allerdings bei abnehmender Aldosteronsekretion. Der Gedanke lag nahe, daß der K-Eintritt in die Zelle eine wichtige Rolle bei der Aldosteronausschüttung spielen könnte.

Ein Ansteigen des Kortikosterons, ohne signifikante Änderung des Zellkaliums bei Stimulation im kaliumreichen Inkubationsmedium oder mit Angiotensin II ist das Ergebnis von Messungen an Zellsuspensionen der zona glomerulosa der Ratte mit der Atomabsorptions-Spektrophotometrie (71).

Mit derselben Methode konnte im Gegensatz dazu ein Ansteigen des intrazellulären Kaliums und des Kortikosterons, ebenfalls im kaliumreichen Medium, gemessen werden.

Doch obwohl Quabain das intrazelluläre Kalium senkte, änderten sich die basale oder stimulierte Kortikosteronsekretion nicht. Daraus wurde gefolgert, daß das Zellkalium die Steroidproduktion beeinflußt, jedoch nicht der einzige Mediator sein kann (79).

Da Aldosteron in beiden Arbeiten nicht gemessen wurde, kann auf sein Verhalten nicht ohne weiteres geschlossen werden, denn die durch Kalium in der Badlösung stimulierte Aldosteronsekretion wird durch Quabain gehemmt, hinweisend auf die Rolle des intrazellulären Kaliums bei der Umwandlung von Kortikosteron zu Aldosteron (83).

Andere Versuche bedienten sich der Elektronenstrahlen (electron microprobe), um intrazelluläres Kalium in Schnitten der zona glomerulosa von Ratten zu bestimmen, die diätetisch behandelt wurden.

Natriumreiche und natriumarme Diät veränderten zwar die in vitro meßbare Aldosteronsekretion erwartungsgemäß, nicht jedoch das intrazelluläre Kalium. Ein höherer Kaliumgehalt der zona glomerulosa im Vergleich zur zona fasciculata und medulla konnte jedoch festgestellt werden, die Wichtigkeit des Kaliums für die Mineralokortikoidsynthese aufzeigend (102).

Kein Unterschied im Kaliumgehalt der einzelnen Zonen wurde widersprechend in der zweiten Arbeit erkannt. Jedoch auch hier wurde eine Änderung im Kaliumgehalt der Glomerulosazellen nach natriumreicher, natriumarmer und kaliumreicher Diät nicht beobachtet, so daß keine Beziehung zur Aldosteronproduktion hergestellt werden konnte (27).

Neben diesen Messungen gibt es aber auch Aussagen über eine enge Beziehung zwischen intrazellulärem Kalium und Aldosteronsekretion.

So erhöht kaliumreiches Badmedium das intrazelluläre Kalium in Schnitten der zona glomerulosa von Hunden mit dem Effekt verstärkter Aldosteronsekretion (69).

Natriumreiche Diät erhöhte im Vergleich zu den anderen Ionen in der zona glomerulosa der Ratte die Kaliumkonzentration bei ebenfalls gesteigerter Sekretion von Aldosteron aus den Schnitten (16).

Schließlich vermehrten auch Stimuli wie Angiotensin II- und Kaliuminfusionen, ACTH-Injektionen und diätetische Natriumverarmung den Kaliumgehalt von Zellsuspensionen der ganzen Nebennierenrinde des Hundes bei stärkerer Aldosteronsekretion. Die zona glomerulosa allein wurde nicht untersucht (8). Die Bestimmung des Kaliums geschah flammenphotometrisch.

Ein Vergleich der Methoden zeigt, daß mit dem Flammenphotometer und der Elektronenmikroprobe immer das Kalium in der ganzen Schicht gemessen wird, also auch im Extrazellulärraum, dem Binde- sowie vaskulären Gewebe und den Zellorganellen. Wie schon erwähnt, können so Gradienten zwischen Zelle und Umgebung oder innerhalb der Zelle nicht erfaßt werden, so daß weniger über das intrazelluläre Milieu als über den Zustand der ganzen Schicht Aussagen gemacht werden.

Die Aufbereitung von Zellen der Suspensionen nur einer Zellart kann diesen Nachteil verringern (80). Der Zellzustand ist dabei jedoch unphysiologisch und Veränderungen im intrazellulären Ionenmilieu sind nicht ausgeschlossen. Besonders ist die zur Kalium- und intrazellulären Wasservolumenmessung notwendige Lyse der Glomerulosazellen ein problematischer Schritt. Bei der anschließenden Kaliumbestimmung des Zellextraktes mit der Atomabsorptionsmethode oder anderen Verfahren ist nicht feststellbar, ob K-Ionen nur aus dem Zytoplasma oder aber auch von Zellorganellen oder Zellmembran, eventuell an Rezeptoren gebunden, stammen.

So ist nicht ausgeschlossen, daß mit diesen Methoden der zytoplasmatische Kaliumgehalt zu hoch bestimmt wird und daraus die im Gegensatz zu dieser Arbeit höheren Konzentrationen resultieren.

4.2.2.1 Zytoplasmatische Kaliumaktivität und intrazelluläre Kaliumkonzentration

Die widersprüchlichen Aussagen über die Rolle des intrazellulären Kaliums sind auffallend. Das ist verständlich, wenn die Verschiedenartigkeit der Versuchsdurchführung in Rechnung gestellt wird. So wurde an Schnitten und Zellsuspensionen gemessen, nach diätetischer Vorbehandlung der Tiere oder bei akuten in vitro-Versuchen.

Von besonderer Wichtigkeit für das Endergebnis scheinen nicht die verschiedenen Meßmethoden wie Flammenemissions-Spektrophotometrie, Atom-Absorptions-Spektrophotometrie oder Flammenphotometrie zu sein, die eine gleich gute Validität haben, wie in (80) gezeigt.

Vielmehr liegen die Schwierigkeiten in der Aufbereitungsart des zu untersuchenden Gewebes, der methodenbegründeten, gleichzeitigen Messung von intrazellulärem und extrazellulärem Kalium und der aufwendigen, aber doch unsicheren, genauen Bestimmung des intrazellulären Raumes. Unter Berücksichtigung aller Störgrößen läßt sich dann mit diesem die intrazelluläre Kaliumkonzentration $[K^+]$ berechnen.

Das ist in einigen Arbeiten für einen Teil der Versuche geschehen. Meist werden jedoch Absolutwerte für den intrazellulären Kaliumgehalt oder für den in der ganzen Zone in Millimol pro Gewichtseinheit angegeben.

Die Standards sind oft nicht einheitlich, so daß Vergleiche schwierig sind. Eine fundierte Aussage über $[K_i^+]$ ist letztlich nicht möglich, auch wenn das interstitielle Kalium als gering konzentriert und damit wie in (102) als vernachlässigbar angegeben wird. Geringe Änderungen in der Verteilung sind so nicht meßbar.

Die genannten Probleme können verringert werden, wenn man, wie in der vorliegenden Arbeit, Informationen direkt aus der

lebenden Zelle erhält und diese mit bewährten Formeln der Elektrochemie verarbeitet.

Damit konnten wir eine mittlere intrazelluläre Kaliumaktivität der Glomerulosazellen von Kontrolltieren von $57,8 \pm 7,9$ mMol/l bestimmen.

Aktivitätsangaben lassen sich nicht ohne weiteres mit den Konzentrationsangaben aus anderen Arbeiten vergleichen, da diese nicht über Berechnung mit Aktivität und Aktivitätskoeffizient gewonnen wurden. Gewöhnlich wird dieser als annähernd gleich für extrazelluläres und intrazelluläres Medium angenommen. Das ist jedoch nicht immer so, wie für proximale Tubuluszellen der Ratte ($\gamma_K=0,4$) (61), des Necturus ($\gamma_K=0,57$) (62), für distale Tubuluszellen der Ratte ($\gamma_K=0,34$) (60) und andere (106) berichtet wurde. Der geringe intrazelluläre Aktivitätskoeffizient soll darauf hinweisen, daß nicht alles intrazellulär befindliche Kalium für die Registrierung mit Mikroelektroden zur Verfügung steht, also auf irgend eine Art und Weise gebunden, in Organellen befindlich und/oder heterogen im Zytoplasma verteilt ist.

Wie ältere und neuere Messungen zeigen, ist aber eher von einer annähernden Gleichheit zwischen zytoplasmatischen und extrazellulären Aktivitätskoeffizienten auszugehen, wobei intrazelluläre Unterschiede zu Organellen oder Kaliumpools nicht ausgeschlossen sind (1, 23, 34, 51, 109).

Die gemessene intrazelluläre Aktivität bezieht sich also nur auf das der Messung zugängliche Kalium, stellt also eine Eigenschaft des Zytoplasmas dar (22); Organellen, immobiles, gebundenes oder sequestriertes Kalium leisten keinen Beitrag zu dieser Aktivität.

Die obigen kleinen Aktivitätskoeffizienten sind durch Aktivitätsmessungen und Bestimmung des gesamten Kaliums von Schnitten, also nicht von reinen Zellpopulationen, berechnet worden.

Kalium aus dem Extrazellularraum, aus Organellen und Sequestern verfälscht deshalb die zytoplasmatische Kaliumkonzentration zu höheren Werten und nachfolgend geringeren Aktivitätskoeffizienten.

Jene wird unter der Voraussetzung berechnet, daß Kalium und Zellwasser in der Zelle homogen verteilt sind und alles Wasser als Lösungsmittel wirkt.

Durch Organellen und Sequestrierungen bedingt, ist das wenig wahrscheinlich. Mit Aktivität und deren Koeffizient berechnen wir deshalb nur die Kaliumkonzentration im als homogen angenommenen Zytoplasma, ohne etwas über die anderen Zellstrukturen aussagen zu können.

Für die zytoplasmatische Kaliumkonzentration von Glomerulosa-zellen der Kontrolltiere dieser Arbeit errechnet sich mit $\gamma_{K,B} = \gamma_{K,Z} = 0,7209$ ein Wert von $C_{K,Z} = 80,18 \text{ mMol/l}$.

Ein Vergleich mit Werten der schon besprochenen Versuche ohne direkte Zellpunktion zeigt Tabelle 6.

Bis auf (27), wo Standardlösungen benutzt wurden, sind die Kaliumkonzentrationen über die Bestimmung des intrazellulären Wasservolumens berechnet worden.

Über die Schwierigkeiten, diesen exakt zu bestimmen, wird ausführlich in (80) berichtet. Dort wie auch in (27) werden mit 68 mMol/l , 77 mMol/l , 76 mMol/l sowie $84 - 104 \text{ mMol/l}$ Konzentrationswerte gefunden, die gut mit diesen dieser Arbeit übereinstimmen. Wie Tabelle 6 zeigt, sind jedoch auch wesentlich höhere Werte ermittelt worden.

Tabelle 6: Übersicht über Methoden und intrazelluläre Kaliumkonzentrationen $[C_K^i]$

Tier	Gewebe	Methode	intrazelluläre Kaliumkonzentration (Kontrollen) (mMol/l)	Aldosteron- sekretion = $f([C_K^i])$	Litera- tur
Hund	Schnitte (zona glomerulosa + wenig zona fasciculata)	Flammen- photometrie	142 SD 11 (n= 6)	ja	(69)
Ratte	Zellsuspension (zona glomerulosa + wenig zona fasciculata)	Atomabsorptions- spektro- photometrie	103,4 SD 19,8 98,8 SEM 8,2 (n=11) (n= 5)	ja jedoch nicht alleiniger Faktor	(79) (80)
Ratte	Zellsuspension (zona glomerulosa)	Atomabsorptions- spektro- photometrie	143 SEM 21 (n= 4) 77 SEM 5 (n= 4) 68 SEM 6 (n= 4)	ja jedoch nicht alleiniger Faktor	(80)
Ratte	Schnitte (zona glomerulosa)	Elektronenstrahl- mikroprobe	84-104 (n=24)	nein	(27)
Ratte	Zellsuspension (zona glomerulosa)	Elektronenstrahl- mikroprobe	166,98 SD 20,43 (n= 7)	nein	(72)

4.2.2.2 Intrazelluläre Kaliumaktivität bei verschiedenen Diäten

Die zytoplasmatische Kaliumaktivität von Glomerulosazellen der Ratte blieb trotz unterschiedlicher Diäten und Aldosteronsekretion konstant. Andere in vivo-Versuche bestätigen dieses Ergebnis hinsichtlich der intrazellulären Kaliumkonzentration, in vitro-Versuche widersprechen dem, wie schon ausführlich dargelegt.

Die hier veröffentlichten Daten sprechen nicht grundsätzlich gegen eine Beeinflussung der Aldosteronsekretion durch intrazelluläres Kalium. Besteht doch die Möglichkeit, daß sich bei gleichbleibender zytoplasmatischer Aktivität dennoch der Kaliumgehalt von Organellen oder Sequestern unter der Diät ändert, zumal bekannt ist, daß intrazelluläre Steroidpools existieren. Diese lassen sich mit Stimuli wie ACTH, Angiotensin II und K beeinflussen (40, 52).

Auch über extrazelluläre Steroidpools mit 18-oxygenierten Aldosteronvorstufen wird berichtet. Fehlen diese in Versuchen mit Zellsuspensionen, so ist die Kapazität zur Aldosteronproduktion bei Stimulation durch Kaliumionen stark eingeschränkt (104). Dies erklärt vielleicht die unterschiedlichen Aussagen bei verschiedenen Gewebepräparationen in bezug auf die Aldosteronproduktion und den Kaliumgehalt, zusätzlich zu der schon besprochenen Methodenkritik.

Auch bei unter Diät gleichbleibender zytoplasmatischer Kaliumaktivität bleibt das Verhalten des intrazellulären Kaliums von besonderem Interesse. Untersuchungen mit neueren Methoden wie LAMMA (Laser-Microprobe Mass-Analyzer) werden zur weiteren Aufklärung beitragen.

4.3 Aldosteronsekretion bei verschiedenen Diäten

Daß unterschiedliche Diäten die Serumelektrolyte in charakteristischer Weise verändern, ist gut bekannt.

So tritt bei Tier und Mensch unter K-Restriktion ein Abfall der Kalium-Serumkonzentration ein, während die Natrium-Serumkonzentration bei verschiedenen Diätkombinationen nahezu unverändert bleibt (32, 73).

Andererseits steigt bei kaliumreicher Diät der Kalium-Serumspiegel an, ebenso bei Natriumrestriktion (14, 97), was jedoch nicht immer gesehen wird (6).

Diese Erkenntnisse gelten als gesichert, und deshalb sind die entsprechenden Messungen in dieser Arbeit nicht noch einmal wiederholt worden.

Das Interesse galt vielmehr der unter Diät veränderten Aldosteronsekretion und damit eventuell verbundenen intrazellulären Kaliumaktivitätsänderungen.

Die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse konnten mit den hier erhaltenen Aldosteronwerten voll bestätigt werden.

Die Aldosteronsekretion steigt bei Kaliumbelastung an (32), ebenso bei Natriumrestriktion (41, 38).

Unter Natriumbelastung hingegen erfolgt ein Absinken des Aldosteronserumspiegels (69, 102).

Das hier gewählte Versuchsmodell erweist sich damit als akzeptabel, zumal, wie bei den meisten Arbeiten, primär nicht die absolute Größe der Aldosteronsekretion interessierte, sondern deren qualitatives Verhalten in bezug auf Kontrollwerte.

Der Vorteil diätetischer Belastung und gezielter Zelluntersuchung in vitro liegt in der multifaktoriellen, physiolo-

gischen Veränderung des Syntheseniveaus der Nebennierenrinde. In vitro-Messungen erlauben dann, den Basalzustand der Zellen in bezug auf Sekretion und inneren Ionenzustand zu beschreiben. Dabei sind natürlich keine physiologischen Bedingungen möglich. Denn die zona fasciculata produziert, wie die Glomerulosazellen, ebenfalls Vorstufen des Aldosteron, die durch die Badlösung diesen zur Verfügung stehen und die Aldosteronsynthese stimulieren (98). Das ist in vivo nicht der Fall. Dort bewegt sich der arterielle Blutstrom von der Kapsel zur medulla, so daß Syntheseprodukte vom Inneren die zona glomerulosa nicht direkt und gleich erreichen (93).

Da Aldosteron nicht in nennenswerter Weise gespeichert, sondern bei Bedarf synthetisiert wird (15), könnte die gleichbleibende Aldosteronproduktion über Stunden durch das Inkubationsprozedere erklärbar sein.

Eine qualitative Beeinflussung der Versuchsergebnisse dadurch ist nicht wahrscheinlich, da die Versuchsbedingungen zwischen den einzelnen Diätgruppen gleich sind und auch deutliche Unterschiede in der Aldosteronsynthese zu messen waren.

Eine Beeinflussung der Aldosteronsekretion durch Aktivitätsänderungen von Kalium im Zytoplasma konnte mit den vorliegenden Messungen nicht dokumentiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit beschreibt den Zusammenhang zwischen intrazellulärer Kaliumaktivität und Aldosteronsekretion von Nebennieren der Ratte in vitro bei verschiedenen Diäten.

Von der zona glomerulosa wurden Zellmembranpotentiale mittels einfacher Potentialelektroden und kaliumselektive Potentiale mittels kaliumsensitiver Elektroden aufgezeichnet. Mit diesen Daten erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Kaliumaktivität. Die Aldosteronsekretion wurde mit einem Radioimmunoassay bestimmt.

Die Messungen ergaben folgende Ergebnisse:

- 1) Das Zellpotential der zona glomerulosa von Kontrolltieren beträgt -60 mV.
- 2) Das Zellpotential ändert sich nicht bei natriumarmer, natriumreicher und kaliumreicher Kost.
- 3) Die intrazelluläre Kaliumaktivität von zona glomerulosa-Zellen der Kontrolltiere hat einen Wert von 57,8 mMol/l
- 4) Die intrazelluläre Kaliumaktivität ist unabhängig von natriumarmer, natriumreicher oder kaliumreicher Diät.
- 5) Die Aldosteronsekretion in vitro steigt bei natriumarmer und kaliumreicher Diät und sinkt bei natriumreicher Diät im Vergleich zur Standarddiät.

Die Versuche zeigen, daß die Aldosteronsekretion nicht vom Membranpotential und der intrazellulären zytoplasmatischen Kaliumaktivität gesteuert wird. Der genaue Angriffspunkt des Kaliums bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6 LITERATUR

- 1 ADRIAN, R.H. (1956): The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle
J. Physiol. 133, 631-658
- 2 AGUILERA, G., CATT, K.J. (1978): Regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin-system during sodium restriction in rats
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4057-4061
- 3 ARMSTRONG, W. McD., GARCIA-DIAZ, J.F. (1980):
Ion-selective microelectrodes: theory and technique
Federation Proceedings 39, 2851-2859
- 4 ARNOLD, J. (1866): Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren
Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin 35, 64-107
- 5 AYRES, P.J., GOULD, R.P., SIMPSON, S.A., TAIT, J.F. (1957):
The in vitro demonstration of differential corticosteroid production within the ox adrenal gland
Bioch. J. 63, 19 p
- 6 BALLA, I., NAGY, K., TARJAN, E., RENCZES, G., SPAT, A. (1981): Effect of reduced extracellular sodium concentration on the function of adrenal zona glomerulosa: studies in conscious rats
J. Endocr. 89, 411-416
- 7 BATES, R.G.: Determination of pH
J. Wiley and Sons, New York (1964)

- 8 BAUMGER, J.S., DAVIS, J.O., JOHNSON, J.A., WITTY, R.T. (1971): Increased adrenocortical potassium in association with increased biosynthesis of aldosterone
Am. J. Physiol. 220, 1094-1099
- 9 BECK, F., LLOYD, J.B.: The Cell in Medical Science
Vol. 3, Academic Press, London (1975)
- 10 BELKIEN, L., SCHÖNESHÖFER, M., OELKERS, W. (1980):
Development and characterization of antisera to 18-hydroxycorticosterone and radioimmunoassay for serum 18-hydroxycorticosterone
Steroids, 35, 427-437
- 11 BIEDL, A.: Innere Sekretion: Ihre physiologischen Grundlagen und ihre Bedeutung für die Pathologie
Urban und Schwarzenberg, Wien (1913)
- 12 BIRKHAUSER, M., GAILLARD, R., RIONDEL, A.M., SCHOLER, D., VALOTTON, M.B., MÜLLER, A.F. (1973): Effect of volume expansion by hyperosmolar and hyperoncotic solutions under constant infusion of angiotensin II on plasma aldosterone in man and its counterbalance by potassium administration
Europ. J. Clin. Invest. 3, 307-316
- 13 BLAIR-WEST, J.R., COGHLAN, J.P., DENTON, D.A., GODING, J.R., WINTOUR, M., WRIGHT, R.D. (1963):
The control of aldosterone secretion
Re. Progr. Hormone Res. 19, 311
- 14 BOYD, J.E., PALMORE, W.P., MULROW, P.J. (1970):
Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat
Endocr. 88, 556-565
- 15 BOYD, J.E. and MULROW, P.J. (1972): Further studies of the influence of potassium upon aldosterone production in the rat
Endocr. 90, 299-301

- 16 BOYD, J.E., MULROW, P.J., PALMORE, W., SILVIO, P. (1973): Importance of potassium in the regulation of aldosterone production
Circulation Research, Suppl. I, Vol. XXXII and XXXIII, I39-I45
- 17 BRALEY, L.M., WILLIAMS, G.H. (1978): The effects of ouabain on steroid production by rat adrenal cells stimulated by angiotensin II, α 1-24 adrenocorticotropin and potassium
Endocr. 103, 1997-2005
- 18 BRIGGS, M.H., CHRISTIE, G.A. (ed): Advances in steroid biochemistry in pharmacology
Academic Press, London (1976)
- 19 CALDWELL, P. (1954): An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and micro-tungsten electrodes
J. Physiol. 126, 169-180
- 20 CAMMANN, K. (1970): Fortschritte auf dem Gebiet der ionen-sensitiven Elektroden
Naturwissenschaften 57, 298-303
- 21 CANNON, P.J., AMES, R.P., LAVAGH, J.H. (1966): Relation between potassium balance and aldosterone secretion in normal subjects and patients with hypertensive or renal tubular disease
J. Clin. Invest. 45, 865-879
- 22 CIVAN M.M. (1978): Intracellular activities of sodium and potassium
Am. J. Physiol. 234, F261-F269
- 23 CIVAN, M.M. (1980): Potassium activities in epithelia
Fed. Proc. 39, 2865-2870

- 24 COLEMAN, T.G., McCAA, R.E., McCAA, C.S. (1974):
Effect of angiotensin II on aldosterone secretion
in the conscious rat
J. Endocr. 60, 421-427
- 25 DAVIS, J.O., URQUHART, J., HIGGINS, J.T. (1963):
The effects of alterations of plasma sodium and
potassium concentration on aldosterone secretion
J. Clin. Invest. 42, 597-608
- 26 DEANE, H.W., SHAW, J.H., GREEP, R.O. (1948): The effect
of altered sodium or potassium intake on the width and
cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's
adrenal cortex
Endocr. 43, 133-152
- 27 DECORZANT, C., RIONDOL, A.M., PHILIPPE, M.-J., BERTRAND,
J., VALLOTTON, M.B. (1977): Detection of Na^+ und K^+ in
the rat adrenal cortex with the electron microprobe
Clin. Sci. Mol. Med. 53, 423-430
- 28 DENTON, D.A., GODING, J.R., WRIGHT, R.D. (1959): Control
of adrenal secretion of electrolyte-active steroids
British Medical Journal 19, Part. I: 447-522, Part II:
522-530
- 29 DORFNER, K.: Ionenaustauscher - Eigenschaften und Anwen-
dung
De Gruyter, Berlin (1963)
- 30 DOUGLAS, J.G. (1980): Potassium ion as a regulator of
adrenal angiotensin II receptors
Am. J. Physiol. 239: E317-E321
- 31 DOUGLAS, W.W. (1968): Stimulus-secretion coupling: the
concept and clues from chromaffin and other cells
Br. J. Pharmac. 34, 451-474

- 32 DOUGLAS, J., AGUILERA, G., KONDO, T., CATT, K. (1978):
Angiotensin II receptors and aldosterone production
in rat adrenal glomerulosa cells
Endocr. 102, 685-696
- 33 EBSTEIN, E. (Hrsg.): Klassiker der Medizin: Thomas
ADDISON - Die Erkrankungen der Nebennieren und ihre
Folgen (1855)
Verlag von Johann Ambrosius Barth (1912)
Unveränderter Nachdruck Zentralantiquariat der DDR
Leipzig (1968)
- 34 EDELMANN, A., CURCI, S., SAMARZIJA, I., FRÖMTER, E.
(1978): Determination of intracellular K^+ activity
in rat kidney proximal tubular cells
Pflügers Archiv 378, 37 - 45
- 35 EISENSTEIN, A.B., HARTROFT, P.M. (1957): Alterations
in the rat adrenal cortex induced by sodium deficiency:
steroid hormone secretion
Endocr. 60, 635-639
- 36 EISENSTEIN, A.B., (ed): The adrenal cortex
Little, Brown and Company, Boston (1967)
- 37 ELLIOTT, M.E., GOODFRIEND, T.L.: Angiotensin alters
 $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in bovine adrenal glomerulosa cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3044-3048
- 38 ENYEDI, P., SPAT, A. (1981): Effect of reduced extra-
cellular sodium concentration on the function of
adrenal zona glomerulosa: studies on isolated
glomerulosa cells from the rat
J. Endocr. 89, 417-421

- 39 ESPINER, E. A., RUN, S., HART, D.S. (1978):
Role of ACTH, angiotensin and potassium in stress-
induced aldosterone secretion
J. Ster. Biochem. 9, 109-113
- 40 FARESE, R.V., SABIR, A., LARSON, R.E., HALEY, J.A. (1980):
Potassium and angiotensin II increase the concentrations
of phosphatidic acid, phosphatidylinositol and poly-
phosphoinositides in rat adrenal capsules in vitro
J. Clin. Invest. 66, 1428-1431
- 41 FATTAH, D.J., WHITEHOUSE, B.J., VINSON, G.P. (1977):
Biosynthesis of aldosterone from 18-hydroxylated
precursors by rat adrenal tissue in vitro
J. Endocr. 75, 187-195
- 42 FERRIS, C.D.: Introduction to bioelectrodes
Plenum Press, New York (1974)
- 43 FREDLUND, P., SALTMAN, S., KONDO, T., DOUGLAS, J. (1977):
Aldosterone production by isolated glomerulosa cells:
modulation of sensitivity to angiotensin II and ACTH
by extracellular potassium concentration
Endocr. 100, 481-486
- 44 FRIEND, D.S., GILULA, N.B. (1972): A distinctive cell
contact in the rat adrenal cortex
J. Cell. Biol. Vol. 53, 148-163
- 45 FOSTER, R., LOBO, M.v., MARUSIC, E.T. (1979):
Studies of relationship between angiotensin II and
potassium ions on aldosterone release
Am. J. Physiol. 237 (4), E363-E366
- 46 FUJIMOTO, M., KUBOTA, T. (1976): Physicochemical
properties of a liquid ion exchanger microelectrode
and its application to biological fluids
Jap. J. Physiol. 26, 631-650

- 47 FUNDER, J.W., BLAIR-WEST, J.R., COGHLAN, J.P., DENTON, D.A. (1969): Effect of plasma (K^+) on the secretion of aldosterone
Endocr. 85, 381-384
- 48 GANN, D.S., CRUZ, J.F., CASPER, A.G., BARTTER, F.C., (1962): Mechanism by which potassium increases aldosterone secretion in the dog
Am. J. Physiol. 202, 991-996
- 49 GIACOMELLI, F., WIENER, J., SPIRO, D. (1965): Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal gland
J. Cell Biol. 26, 499-516
- 50 GREEP, R.O., DEANE, H.W. (1947): Cytochemical evidence for the cessation of hormone production in the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex after prolonged treatment with desoxycorticosterone acetate
Endocr. 40, 417-425
- 51 HANSEN, L., KOCH, M., PLATSCH, K., WIEDERHOLT, M. (1979): Intracellular potassium activity of isolated human and rabbit corneal epithelium
Exp. Eye Res. 29, 367-378
- 52 HERRERA, J., LEON, C., MORAN, L., RAUDALES, L., BERMUDEZ, J.A. (1980): Subcellular metabolic pools in the rat adrenal gland. In vivo effect of acute stimulation with ACTH on steroid biosynthesis
J. Ster. Bioch. 13, 153-162
- 53 HINKE, J. (1959): Glass micro-electrodes for measuring intracellular activities of sodium and potassium
Nature, 184, 1257-1258

- 54 HORNSBY, P.J., O'HARE, M.J. (1977): The roles of potassium and corticosteroids in determining the pattern of metabolism of (^3H) deoxycorticosterone by monolayer cultures of rat adrenal zona glomerulosa cells
Endocr. 101, 997-1005
- 55 HORNSBY, P.J., O'HARE, M.J., NEVILLE, A.M. (1974): Functional and morphological observations on rat adrenal zona glomerulosa cells in monolayer culture
Endocr. 95, 1240-1251
- 56 IUPAC (1975): Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes
Pure and Appl. Chem. 48, 129-132
- 57 JAMES, V.H.T. (ed): Comprehensive endocrinology: The adrenal gland
Raven Press, New York (1979)
- 58 JONES, I.C., HENDERSON, I.W. (ed): General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal gland
Vol 2, Academic Press, London (1978)
- 59 KAWAI, K., SUGIHARA, H., TSUCHIYAMU, H. (1979): The effect of a low potassium diet on the glomerular zone of the adrenal cortex of rats
Acta Path. Jap. 29, 351-362
- 60 KHURI, R.N., AGULIAN, S.K., KALLOGLIAN, A. (1972): Intracellular potassium in cells of the distal tubule
Pflügers Arch. 335, 297-308
- 61 KHURI, R.N., AGULIAN, S.K., BOGHARIAN, K. (1974): Electrochemical potentials of potassium in proximal renal tubule of rat
Pflügers Arch. 346, 319-326

- 62 KHURI, R., HAJJAR, J.J., AGULIAN, S., BOGHARIAN, K.,
KALLOGHLIAN, A., BIZRI, H. (1972):
Intracellular potassium in cells of the proximal
tubule of *necturus maculosus*
Pflügers Arch. 338, 73-80
- 63 KRÖSKEMPER, H.L., REICHERTZ, P. (1959): Änderungen des
Elektrogramms der Nebennieren nach intravenöser Injek-
tion von Corticotropin
Acta Endocrinologica 30, 197-204
- 64 LABHART, A.: Klinik der inneren Sekretion
Springer Verlag Berlin (1971)
- 65 LARAGH, J.H., STOERK, H.C. (1957): A study of the
mechanism of secretion of the sodium-retaining hormon
(aldosterone)
J. Clin. Invest. 36, 383-391
- 66 LEMLEY-STONE, J., DARBY, W., MENEELY, G.R. (1961):
Effect of dietary sodium: potassium ratio on body
content of sodium and potassium in rats
Am. J. Cardiol. 8, 748-753
- 67 LEV, A.A., ARMSTRONG, W. McD. (1975):
In: Ionic activities in cells
Curr. Top. Membr. Trsp. Vol. 6, 59-123
- 68 LEVER, J.D. (1956): Cytological studies on the hypo-
physectomized rat adrenal cortex: the alterations of
its fine structure following ACTH administration and
on lowering the Na/K ratio
Endocr. 58, 163-179
- 69 LOBO, M.V., MARUSIC, E.T., AGUILERA, G. (1978):
Further studies on the relationship between potassium
and sodium levels and adreno-cortical activity
Endocr. 102, 1061-1068

- 70 LUETSCHER, J.A., AXELROD, B.J. (1954):
Increased aldosterone output during sodium
in normal men
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 87, 650
- 71 MACKIE, C.M., SIMPSON, E.R., MEE, M.S.R., TAIT, S.A.S.,
TAIT, J.F. (1977):
Intracellular potassium and steroidogenesis of isolated
rat adrenal cells: effect of potassium ions and
angiotensin II on purified zona glomerulosa cells
Clin. Sci. Mol. Med., 53, 289-296
- 72 MACKIE, C., WARREN, R., SIMPSON, R. (1978): Investigation
into the role of calcium ions in the control of
steroid production by isolated adrenal zona glomerulosa
cells of the rat
J. Endocr. 77, 119-127
- 73 MANITIUS, A., LEVITIN, H., BECK, D., EPSTEIN, F.H. (1960):
On the mechanism of impairment of renal concentrating
ability in potassium deficiency
J. Clin. Invest. 39, 684-691
- 74 MARTIN, C.R. (ed): Textbook of endocrine physiology
Williams and Wilkins comp., Baltimore (1976), XIII
- 75 MASON, P.A., FRASER, R., MORTON, J.J., SEMPLE, P.F.,
WILSON, A. (1977): The effect of sodium deprivation and
of angiotensin II infusion on the peripheral plasma
concentrations of 18-hydroxycorticosterone, aldosterone
and other corticosteroids in man
J. Ster. Bioch. 8, 799-804
- 76 MATTHEWS, E.K. (1967): Membrane potential measurement in
cells of the adrenal gland
J. Physiol. 189, 139-148

- 77 MATTHEWS, E.K., SAFFRAN, M. (1967): Steroid production and membrane potential measurement in cells of the adrenal cortex
J. Physiol. 189, 149-161
- 78 MATTHEWS, E.K., SAFFRAN, M. (1973): Ionic dependence of adrenal steroidogenesis and ACTH-induced changes in the membrane potential of adrenocortical cells
J. Physiol. 234, 43-64
- 79 MENDELSON, F.A., MACKIE, C. (1975): Relation of intracellular K^+ and steroidogenesis in isolated adrenal zona glomerulosa and fasciculata cells
Clin. Sci. Mol. Med. 49, 13-26
- 80 MENDELSON, F.A.D., WARREN, R.L. (1975):
Micromethods for the simultaneous measurement of intracellular potassium and corticosterone output of isolated adrenal cortical cells
Clin. Sci. Mol. Med. 49, 1-12
- 81 MIKHAIL, Y. (1973): A study of some of the histological and histochemical features of the zona reticularis
Acta Anat. 84, 498-508
- 82 MÜLLER, J.: Regulation of aldosterone biosynthesis
Springer Verlag Berlin (1971)
- 83 MÖLLER, J. (1979): The conversion of 18-hydroxycorticosterone and 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone to aldosterone by rat adrenal tissue: evidence for an alternative biosynthetic pathway
J. Ster. Bioch. 13, 245-251

- 84 MÖLLER, J., HUBER, R. (1969): Effects of sodium deficiency, potassium deficiency and uremia upon the steroidogenic response of rat adrenal tissue to serotonin, potassium ions and adrenocorticotropin
Endocr. 85, 43-49
- 85 MULROW, P.J., LIEBERMAN, A.H., JOHNSON, B.B., LUETSCHER, J.A. (1956): Potassium to sodium ratio as an index of aldosterone output
J. Clin. Invest. 35, 726
- 86 NATKE, Jr., E., KUBELA, E. (1979): Electrical responses in rat adrenal cortex: possible relation to aldosterone secretion
Am. J. Physiol. 237, E 158 - E 162
- 87 NETTER, H.: Theoretische Biochemie
Springer Verlag Berlin (1959)
- 88 OETTINGER, C.W., WELLS, J.O. (1978): The relative influence of potassium (K^+) and intravascular volume (IV) in the regulation of aldosterone (aldo) secretion
Kidney Internat. 14.2, 700
- 89 REISS, M., BALINT, J., OESTREICHER, F., ARONSON, V. (1936): Zur morphogenetischen Wirkung und biologischen Wirkung des kortikotropen Wirkstoffes
Endokrinologie 18, 1-10
- 90 ROBINSON, R.A., STOKES, R.H.: Electrolyte solutions
Butterworths, London (1959)
- 91 SAND, G., FRÖHLING, J., PENASSE, W., CLAUDE, A. (1972): Distribution du cholestérol dans la corticosurrénale du rat: analyse morphologique et chimique des fractions subcellulaires, isolées par centrifugation différentielle
J. Microscopie, 15, 41-66

- 92 SCHÖNESHÜFER, M., FENNER, A., DULCE, H.J. (1981):
Assessment of eleven adrenal steroids from a single
serum sample by combination of automatic high-
performance liquid chromatography and radioimmunoassay
(HPLC-RIA)
J. Ster. Bioch. 14, 377-386
- 93 SCHULSTER, D., BURSTEIN, S., COOKE, B.A.:
Molecular endocrinology of the steroid hormones
John Wiley and Sons, London (1976)
- 94 SCHULSTER, D., LEVITZKI, A.: Cellular receptors for
hormones and neurotransmitters
John Wiley and Sons, Chichester (1980)
- 95 SHELTON, J.H., JONES, A.L. (1970): The fine structure
of the mouse adrenal cortex and the ultrastructural
changes in the zona glomerulosa with low and high
sodium diets
Anat. Rec. 170, 147-182
- 96 SIMPSON, S.A., TAIT, J.F., WETTSTEIN, A., NEHER, R.
(1954): Aldosteron - Isolierung und Eigenschaften.
Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandter
Stoffe
Helvetica Chimica Acta, Vol. 37, 1163-1200
- 97 SINGER, B., STACK-DUNNE, M.P. (1955): The secretion of
aldosterone and corticosterone by the rat adrenal
Endocr. 12, 130-146
- 98 STACHENKO, J., GIROUD, C.J.P. (1959): Functional
zonation of the adrenal cortex: pathways of cortico-
steroid biogenesis
Endocr. 64, 730-741

- 99 SUGIHARA, H. (1977): Differentiation of the fetal adrenal cortex of rats - its experimental observation in vivo
Acta Path. Jap. 27, 759-773
- 100 SWANN, H.G. (1940): The pituitary-adrenocortical relationship
Physiol. Rev. 20, 493-513
- 101 SZALAY, K.SZ. (1969): Inhibiting effect of angiotensin on potassium accumulation of adrenal cortex
Bioch. Pharmacol., 18, 962-964
- 102 SZALAY, K.SZ., BACSY, E., STARK, E. (1975): Adrenal potassium and sodium in experimental hyper- and hypoaldosteronism in the rat. Determination by electron probe x-ray microanalysis
Acta Endocrinologica 80, 114-125
- 103 THOMAS, R. (1972): Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones
J. Physiol. 220, 55-71
- 104 VINSON, G.P., WHITEHOUSE, B.J., GODDARD, C., SIBLEY, C.P. (1979): Steroid profiles formed by rat adrenocortical whole tissue and cell suspensions under different conditions of stimulation
J. Ster. Bioch. 11, 175-183
- 105 WALKER, J.L. (1971): Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes
An. Chem. 43, 89A - 93A
- 106 WALKER, J.L., BROWN, H.M. (1977): Intracellular ionic activity measurements in nerve and muscle
Physiol. Rev. 57, 729-778

- 107 WELLEN, J., BENRAAD, J. (1971): Observation on the mechanism of potassium-induced stimulation of corticosteroid biosynthesis in vitro
Acta Endocr. (Kbh) Suppl. 155, 122
- 108 WIEDERHOLT, M., DANISEVSKIS, P., HANSEN, L., LICHEY, H.J., PLATSCH, K. (1980): The effects of extracellular potassium, ouabain, and prostaglandins on intracellular potassium activity in sheep cardiac purkinje fibers
Pflügers Arch. 388, 169-175
- 109 ZEUTHEN, T. (1978): Intracellular gradients of ion activities in the epithelial cells of the necturus gall-bladder recorded with ion-selective microelektrodes
J. Membr. Biol. 39, 185-218

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich der Freien Universität Berlin, speziell dem Institut für Klinische Physiologie am Klinikum Steglitz, herzlich dafür danken, daß ich meine Doktorarbeit dort ausführen konnte.

Ich erhielt alle erdenkliche Hilfe und gewann einen Einblick in die Grundlagenforschung, der mir für die weitere Tätigkeit von Nutzen sein wird.

Besondere Erwähnung verdient mein Doktorvater, Herr Prof. Dr. med. M. Wiederholt. Er unterstützte mich unermüdlich und war stets zum Gespräch über den Fortlauf der Arbeit bereit. Dafür danke ich ihm sehr.

Große Hilfe fand ich auch in Herrn Dr. med. J. Kana, Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. T. Jentsch, Herrn P. Weskamp, Frau M. Koch und Frau A. Krolik.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Oelkers und Herrn Dr. med. L. Belkien für die Durchführung des Aldosteron-Radioimmunoassays und dem Institut für Medizinische Statistik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. G. Fuchs.

Darüber hinaus möchte ich die freundliche Aufnahme durch die Mitarbeiter des Institutes hervorheben.

LEBENS LAUF

19. April 1948	geboren in Berlin
Eltern	Paul Hampel, Werkzeugmacher, Ingenieur für Maschinenbau Margot Hampel, geb. Daecke, Sachbearbeiterin
1954 - 1962	Grundschule in Potsdam und Berlin
1962 - 1966	Oberschule in Berlin
1966	Erwerb der Hochschulreife Erwerb des Facharbeiterbriefes als Elektromechaniker
1966 - 1971	Studium an der Technischen Hochschule Ilmenau, Sektion Informationstechnik und theoretische Elektrotechnik, Abschluß als Diplomingenieur
1971 - 1973	Wissenschaftlicher Assistent am Physiologischen Institut der Humboldt-Universität zu Berlin
1973 - 1975	Diplomingenieur im Werk für Meßelektronik in Berlin
1975 - 1976	Betriebshandwerker an der Evang. Stephanus-Stiftung
1976	Übersiedlung nach Berlin-West
1977 - 1983	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1980 - 1983	Doktorarbeit am Institut für Klinische Physiologie des Klinikums Steglitz der FU Berlin bei Herrn Prof. Dr. med. M. Wiederholt
1981	Arbeit als studentische Hilfskraft am gleichen Institut
1982 - 1983	Praktisches Jahr
1983	Ärztliche Abschlußprüfung am 17. Oktober
1983	Approbation am 7. November
1984	Ab 1. Januar Assistenzarzt an der Anaesthesieabteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Spandau

